



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Efecto de los metabolitos secundarios de *Desmodium molliculum* (“manayupa”) sobre el nivel de colesterol en ratas con hipercolesterolemia inducida

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos
Vegetales y Terapéuticos

AUTOR

Danilo Arturo BARRETO YAYA

ASESOR

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Barreto D. Efecto de los metabolitos secundarios de *Desmodium molliculum* (“manayupa”) sobre el nivel de colesterol en ratas con hipercolesterolemia inducida [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2018.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS**

Siendo las **09:00 hrs. del 06 de diciembre de 2018** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Eduardo Flores Juárez e integrado por los siguientes miembros: Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (Asesor), Dra. Norma Julia Ramos Cevallos, Mg. Luis Alberto Rojas Ríos y la Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Desmodium malliculum* (manayupa) SOBRE EL NIVEL DE COLESTEROL EN RATAS CON HIPERCOLESTEROLEMIA INDUCIDA"**, presentada por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **DANILO ARTURO BARRETO YAYA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Dieciocho (18) Muy bueno

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **DANILO ARTURO BARRETO YAYA**, el Grado Académico de Magíster en **Recursos Vegetales y Terapéuticos**.

Siendo las *11:00* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *11:10* hrs. del 06 de diciembre de 2018.

Dr. Eduardo Flores Juárez (P.P., T.C.)
Presidente

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P. Aux., T.C.)
Miembro

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P.P., T.C.)
Miembro - Asesor

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos (P.P., T.C.)
Miembro

Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha (P.P., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Dedicatorias

*A mi familia, por su paciencia y
aliento constante*

*A mi asesor, Dr. Pablo Bonilla por su
dedicación, paciencia, ayuda y
buenos consejos*

*A mis amigos,
Rodolfo, Andrés Eustaquio,
Eriko y en especial para la
inolvidable Hilda.*

Para Luisa, por supuesto

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación Problemática.....	1
1.2. Formulación del Problema	3
1.3. Justificación teórica	3
1.4. Justificación Práctica	5
1.5. Objetivos	5
1.5.1. Objetivo General	5
1.5.2. Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Marco Filosófico	7
2.2. Antecedentes	8
2.2.1. Investigaciones en el extranjero	8
2.2.2. Investigaciones en el Perú	12
2.3. Bases Teóricas	14
2.3.1. Desmodium molliculum.....	14
2.3.2. Colesterol, lipoproteínas y metabolismo del colesterol	16
2.3.3. Ratas como modelo de Hipercolesterolemia.....	23
2.3.4. Agentes Hipolipemiantes.....	26
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	32
3.1. Tipo y Diseño de Investigación	32
3.1.1. Tipo investigación.....	32
3.1.2. Método y Diseño de Investigación	32
3.2. Muestra	32
3.2.1. Población y muestra vegetal	32
3.2.2. Población y muestra animal	34
3.2.2.1 Población.....	34
3.2.2.2 Muestra animal.	34
3.3. Procesamiento de las muestras.....	34
3.3.1. Acondicionamiento del material vegetal	34
3.3.2. Obtención del extracto etanólico	35
3.4. Estudio Químico	35
3.4.1. Marcha fitoquímica preliminar	35
3.4.2. Estudio cromatográfico	35

3.4.3. Elucidación estructural mediante espectrofotometría UV	39
3.5. Ensayos Biológicos: Efecto hipocolesterolémico del extracto etanólico de hojas de <i>D. molliculum</i>	40
3.5.1. Condiciones previas a las series experimentales	40
3.5.2. Diseño experimental	40
3.5.3. Análisis de los resultados.....	42
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1. Presentación de resultados	43
4.1.1 Marcha fitoquímica preliminar	43
4.1.2. Estudio cromatográfico	44
4.1.3. Estudio por espectroscopía UV.....	53
4.1.4. Resultados de prueba de efecto hipocolesterolémico del extracto alcohólico de <i>D. molliculum</i> Manayupa	57
4.2. Discusión de resultados.....	63
4.2.1. Discusión de resultados	63
4.3. Pruebas de Hipótesis	70
CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS.....	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios en especies del género *Desmodium*. (p. 16)

Tabla 2. Principales tipos de lipoproteínas del plasma humano y su composición. (p. 21)

Tabla 3. Principales tipos de apolipoproteínas de las lipoproteínas del plasma humano. (p. 22)

Tabla 4. Ventajas y desventajas de diferentes animales de experimentación como modelo de hipercolesterolemia. (p. 24)

Tabla 5. Valores de referencia en suero de ratas macho Sprague-Dawley. (p. 26)

Tabla 6. Drogas hipolipemiantes sintéticas y sus acciones. (p. 27)

Tabla 7. Resultados de la cromatografía Preparativa de los eluatos. (p.39)

Tabla 8. Resultados de la marcha fitoquímica. (p. 43)

Tabla 9. Revelado de flavonoides en cromatografía en capa delgada. (p. 44)

Tabla 10. Resultados del análisis por espectroscopía UV de barrido. (p. 56)

Tabla 11. Valores medios de colesterol total y LDLc luego del periodo de inducción. (p. 57)

Tabla 12. Valores medios de colesterol total HDLc, LDLc y triglicéridos luego del periodo de 30 días de tratamiento. (p. 60)

Tabla 13. Análisis de distribución normal de los datos por prueba de Ryan-Joiner. (p. 72)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumen biosíntesis de colesterol (p. 18)

Figura 2. Resumen del metabolismo corporal global del colesterol (p. 19)

Figura 3. Apolipoproteínas. (p. 20)

Figura 4. Metabolismo del Colesterol. (p. 23)

Figura 5. β -sitosterol (p. 29)

Figura 6. Soyasaponina I y soyasapogenol B (p. 29)

Figura 7. Mecanismos y niveles de acción hipocolesterolémica de los esteroides vegetales. (p. 30)

Figura 8. Recolección de la muestra por el autor, en el distrito de Baños del Inca Cajamarca (p. 33)

*Figura 9. Cromatografía de las fracciones del extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum*.* (p. 33)

*Figura 10. Cromatografía de las fracciones del extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum*.* (p. 36)

Figura 11. Extracción en fase sólida con resina Diaion HP20. (p. 37)

*Figura 12. Cromatografía en capa delgada de extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* y de sus fracciones comparada con extracto metanólico de harina de soya.* (p. 45)

Figura 13. Cromatografía de flavonoides. (p. 45)

Figura 14. Investigación de vitexina. (p. 46)

Figura 15. Cromatografía de isoflavonoides revelado con luz UV 366 nm. (p. 47)

Figura. 16 Cromatografía de isoflavonoides revelado con reactivo de Neu. (p. 47)

Figura 17 Cromatografía de saponinas. (p. 48)

Figura. 18 Cromatografía en capa delgada de fracción eluída con resinaDiaion HP 20. (p. 49)

Figura 19. Cromatografía CCD de saponinas. (p. 49)

Figura 20. Control cromatográfico del fraccionamiento de flavonoides con resina Diaión HP 20. (p. 50)

Figura 21. Control cromatográfico de eluatos liberados de flavonoides. (p. 51)

Figura 22. Espectro UV de barrido de diferentes fracciones eluidas. (p. 52)

Figura 23. Cromatografía preparativa. (p. 53)

Figura 24. Espectro UV de barrido de la franja n-But-sup2 Rf 0,66 solvente MeOH. (p. 54)

Figura 25. Espectro UV de barrido de la franja n-But-sup2 Rf 0,66 solvente MeOH + MeONa. (p. 54)

Figura 26. Espectro UV de barrido de la franja AcOEt-sup Rf 0,96 solvente MeOH. (p. 55)

Figura 27. Espectro UV de barrido de la franja AcOEt-sup Rf 0,96 solvente MeOH + MeONa. (p. 55)

Figura 28. Comparación de niveles medios de colesterol total mg/dl de control negativo y control positivo, al final de etapa de inducción de hipercolesterolemia. (p. 57)

Figura 29. Comparación de niveles medios de LDLc en mg/dl de control negativo y control positivo, al final de la etapa de inducción de hipercolesterolemia. (p. 58)

Figura 30. Prueba t-Student Comparación LDLc en mg/dl de control negativo y control positivo, al final de la etapa de inducción de hipercolesterolemia. (p. 59)

Figura 31. Comparación de los valores medios de colesterol total (mg/dl) al final del periodo de tratamiento. (p. 60)

Figura 32. Intervalos de confianza para colesterol total al final del periodo de tratamiento. (p. 61)

Figura 33. Comparación de niveles medios de LDLc en mg/dl al final del tratamiento. (p. 62)

Figura 34. Intervalos de confianza para LDLc al final del periodo de tratamiento. (p. 63)

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto hipocolesterolémico del extracto alcohólico de hojas de *Desmodium molliculum* (HBK) DC “manayupa” en ratas con dieta hipercolesterolémica. También se evaluó la presencia de metabolitos que puedan justificar la actividad biológica de los extractos alcohólicos de hojas de *D. molliculum*. Se colectó hojas de esta especie en el distrito de Baños de Inca, departamento de Cajamarca, se secó, se molió y se maceró con alcohol. Se trabajó con 22 ratas que se dividió en 4 grupos, un grupo control con alimento balanceado, y 3 grupos al que se alimentó con dieta hipercolesterolemica durante un mes con colesterol suspendido en aceite de oliva a una dosis de 200 mg/kg peso corporal. El tratamiento consistió en administrar a un grupo extracto etanólico seco suspendido en CMC al 0,5%, a la dosis de 500 mg /kg peso corporal, y otro grupo se trató con droga estándar atorvastatina a la dosis 2 mg/kg peso corporal, al grupo control negativo se le administró suero fisiológico y al grupo control positivo se le siguió administrando colesterol 200 mg/kg. El tratamiento duró 30 días. La evaluación química nos permitió confirmar la presencia de flavonoides, isoflavonas y saponinas en el extracto alcohólico. Los resultados del ensayo biológico mostraron que el extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* no posee una actividad hipocolesterolémica significativa a la dosis ensayada ($p = 0,258$).

Palabras Clave: *Desmodium molliculum*, Flavonoides, saponinas, hipocolesterolémico.

SUMMARY

The aim of this research was to evaluate the hypocholesterolemic effect from alcoholic extract of *Desmodium molliculum* “manayupa” leaves on rats fed with hypercholesterolemic diet. Likewise, the presence of metabolites which may justify the biological activity of *D. molliculum* leaves alcoholic extracts was studied. The leaves were collected at Baños del Inca district, department of Cajamarca, Perú, they were dried, ground and then macerated with alcohol. 22 rats divided into four groups were used. The control group was fed with balanced food, and the other three groups were fed with hypercholesterolemic diet for a month with cholesterol suspension in olive oil using a dose of 200 mg/kg. One group was subjected to 500 mg /kg doses of dried ethanolic extract suspended in 0,5% CMC. Other group was treated with 2 mg/kg doses of standar drug Atorvastatin. Saline solution was given to the negative control group and 200 mg/kg doses of cholesterol were kept constant in all other groups. The treatment lasted 30 days. The chemical exam allowed to confirm the presence of flavonoids, isoflavones and saponins in the alcoholic extract. The results of the biological exam showed that the *D. molliculum* leaves alcoholic extract has not a statistically significant effect on cholesterol total concentration in rats' blood ($p = 0,258$).

Keywords: *Desmodium molliculum*, flavonoids, saponins, hypocholesterolemic

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

En el Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles por la Organización Mundial de la Salud OMS (2014) se manifiesta que “la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares es motivo de preocupación a nivel mundial pues éstas se encuentran como la principal causa de mortalidad por enfermedades no transmisibles en el año 2012” (p. IX).

La hipercolesterolemia es la presencia de niveles elevados de colesterol en sangre y para Kannel et al (1964); “es uno de los factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.” (p. 898). En nuestro país en el estudio TORNASOL II, Segura et al. (2013) reportaron que “el colesterol como factor de riesgo se incrementó en 5 años de 10% a 13,8%, en términos globales, en las mujeres de 11,1% a 16,0% y en los hombres de 8,8% a 11%; el aumento se observó en todas las regiones geográficas y en todos los grupos etarios” (p. 7).

Las estatinas (simvastatina y atorvastatina) son drogas que se prescriben en el tratamiento hipolipemiante y son las drogas de elección para disminuir el LDL colesterol (LDLc), además hay estudios que indican que disminuyen las complicaciones cardiovasculares aunque presentan como principal efecto secundario la miopatía (Golomb y Evans, 2008), así se recomienda una estrecha vigilancia de los posibles efectos adversos de las estatinas sobre músculos.

Desmodium molliculum (pata de perro, pega-pega, manayupa), es una especie vegetal herbácea que crece en varias zonas de nuestro país: Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Junín. Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco. Hammond et al (1998) reportaron que en la medicina folclórica peruana se usa principalmente por su acción depurativa y anti-inflamatoria de hígado y riñones, tanto es así que incluso el Programa de Medicina Complementaria del Seguro Social de Salud (ESSALUD) lo usa como agente depurativo previo al tratamiento de fondo con otras especies vegetales de acción más específica. Luego de hacer la revisión bibliográfica no se encontró investigaciones, ni estudios sobre su probable efecto hipocolesterolémico, aunque se podría esperar este efecto si nos atenemos a la presencia de metabolitos secundarios tales como flavonoides y saponinas que por estudios en otras especies de la familia Fabaceae, familia a la que pertenece *D. molliculum*, se podrían asociar a una actividad biológica hipocolesterolémica.

En nuestro país esta especie ha sido poco estudiada desde el punto de vista químico, mas no así su actividad biológica:

Desde el punto de vista químico solo se han realizado estudios de *screening* fitoquímico (estudio preliminar de composición química) (Chang, Klinar, Castillo, Peralta, 2009), (Lozano et al. 2001), mientras que respecto a la actividad biológica se ha ensayado su acción antiinflamatoria (Acero, Ticona, Millones, Torres, 2012), actividad cicatrizante (Lozano et al., 2001), efecto anticonceptivo (Acero, 2010), actividad antidiurética de sus extractos alcohólicos (Aicardi et al. 2012).

1.2. Formulación del Problema

La persistencia de las enfermedades coronarias en el Perú y en el mundo y su estrecha relación con las dislipidemias, así como los efectos adversos de las drogas hipolipemiantes hace necesaria la búsqueda de alternativas como agentes depurativos. Parte de la acción depurativa consiste en disminuir los niveles de colesterol en sangre, y al no encontrar estudios farmacológicos preliminares de este efecto en nuestra planta, cabe preguntar si ¿los metabolitos secundarios hallados en extractos alcohólico de hojas de la especie *Desmodium molliculum* contribuirán a bajar los niveles de colesterol en sangre de ratas albinas alimentadas con dieta hipercolesterolémica?

1.3. Justificación teórica

A nivel mundial se han investigado muchas plantas medicinales y se ha hallado compuestos bioactivos, principalmente metabolitos secundarios, a los cuales se les ha practicado ensayos in vitro respecto a su actividad antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana. En nuestro país tenemos a *Desmodium molliculum*, planta herbal que crece en varias zonas de la sierra y cuyos usos en la medicina tradicional son como depurativo de la sangre, diurética, desinflamante de hígado y de riñones (Hammond et al. 1998). En el Perú, algunos de estos efectos han sido evaluados in vitro: Efecto anticonceptivo y postcoital del extracto etanólico de las hojas del *Desmodium molliculum* (HBK).DC “Manayupa” en ratas hembras Holtzmann (Acaro, 2013), “Efecto Diurético del Extracto de *Desmodium molliculum* “Manayupa” en Ratas Albinas” (Aicardi, et al. 2012), Actividad Antiinflamatoria del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum* en el

Modelo Murino de Asma (Acero et al., 2012), Actividad Antiinflamatoria y cicatrizante en ratones (Lozano et al. 2001).

Los estudios fitoquímicos realizados en nuestro país sobre *D. molliculum*, y sobre otras especies del género *Desmodium* en el extranjero, demuestran la presencia abundante de flavonoides, y presencia moderada de saponinas (Lozano et al 2001); (Chang et al., 2009). En la bibliografía internacional se encuentran trabajos con ensayos in vitro que demuestran la actividad de flavonoides como hepatoprotectores, y con acción hipocolesterolémica (Lee et al., 2005); (Ganjhu, 2014); asimismo ensayos de la acción hipocolesterolémica de algunas saponinas (Kang, 2010; Lin et.al., 2005). Isoflavonoides y saponinas son compuestos que se hallan con mucha frecuencia en especies de la familia Fabaceae (Leguminosae) a la que pertenece la soya (*Glycine max*), por eso que también los podemos encontrar en especies del género *Desmodium* que también pertenece a la familia Fabaceae (Taylor, 2009; Lin,1993; Ingham, 1984). Estos hechos justificarían una investigación fitoquímica que nos permita comprobar la presencia de flavonoides e isoflavonoides y soyasaponinas en la especie *D. molliculum*.

Por otro lado, es conocido que a algunos animales de experimentación se les puede inducir hipercolesterolemia constituyendo así modelos útiles para estudiar la homeostasis del colesterol, y a su vez para evaluar posibles tratamientos para la reducción de los niveles de colesterol circulante (Chan, 2015; Santos-Gallego, 1987). Es en base a estos antecedentes que hemos decidido realizar esta investigación en la que evaluaremos el efecto del extracto alcohólico de *D. molliculum* en ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica.

1.4. Justificación Práctica

La comparación de los resultados de los estudios TORNASOL I y II, realizados en nuestro país, muestran que [los niveles de] “el colesterol se incrementó en 5 años de 10% a 13,8%, en las mujeres de 11,1% a 16,0% y en los hombres de 8,8% a 11%; el aumento se observa en todas las regiones geográficas y en todos los grupos etarios” (Segura et al., 2013; pag. 6). Este hecho pone de manifiesto que se requiere de alternativas seguras y accesibles para controlar esta dislipidemia.

Demostrar que los extractos de hojas de *D. molliculum* resultan efectivos en el control de la hipercolesterolemia en animales de experimentación puede ser el punto de partida para investigar científicamente su efecto en humanos y así obtener una alternativa natural y accesible dada la amplia distribución de esta especie en nuestro país. Además los resultados de este trabajo podrían servir como sustento científico de su uso como agente depurativo que ESSALUD ya le da a esta especie en su programa nacional de Medicina Complementaria.

1.5. Objetivos

1.5.1. *Objetivo General*

Evaluar el efecto de los metabolitos secundarios presentes en extractos alcohólicos de hojas de *Desmodium molliculum* “Manayupa” sobre el nivel de colesterol en sangre de ratas albinas cepa Holtzmann alimentadas con dieta hipercolesterolemica.

1.5.2. *Objetivos Específicos*

- Determinar la presencia de metabolitos secundarios polifenólicos y triterpenoides en extracto alcohólico de hojas de *Desmodium molliculum*.
- Elevar la colesterolemia en ratas albinas macho cepa Holtzmann, con dieta hipercalórica y alta en colesterol (dieta hipercolesterolémica).
- Establecer si la ingesta de extractos alcohólicos de *Desmodium molliculum* afectan significativamente el nivel de colesterol en sangre de ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco Filosófico

Durante los últimos años en nuestro país, ha existido un progreso en el entendimiento de las acciones que posee la especie *Desmodium molliculum*. En ese sentido se han estudiado sus acciones antioxidante, antialérgica, anticonceptiva, diurética, depurativa. No obstante, el conocimiento que se tiene y que parte de la experiencia humana es amplia y en ocasiones, poco documentada y en adición a esto, tomando en cuenta que se tiene una innumerable fuente de conocimientos que se ofrecen desde el exterior, hay pendiente por indagar una actividad particular en esta especie que no ha sido lo suficientemente documentada, su actividad hipocolesterolémica, por lo que éste será el objeto de estudio en el presente trabajo. El método a usar será de carácter hipotético deductivo basado en los principios del Positivismo. Usaremos métodos, instrumentos y técnicas confiables respaldados por su uso exitoso en trabajos en nuestro país y en el extranjero. Cabe recordar que todo conocimiento conlleva el riesgo de error, que un conocimiento no es el reflejo de las cosas y que ninguna teoría científica está libre de error. Nuestros resultados serán valorados con las herramientas estadísticas pertinentes.

2.2. Antecedentes

2.2.1. Investigaciones en el extranjero

Investigaciones Acerca De Actividad Farmacológica de Especies de Desmodium.

En Nigeria, Steven y Ude (2016) estudiaron el efecto del extracto acuoso de hojas de *Desmodium velutinum* sobre el perfil lipídico de suero de ratas albinas Wistar, “usando dosis de extracto acuoso de hojas de *D. velutinum* de 5 mg/kg se produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) en suero tanto del colesterol total, como de LDL y triglicéridos totales en ratas alimentadas con dieta alta en grasa (cerebro de vaca 10 mg/kg)” (p. 47).

En la universidad de Andhra, India, Mutyala y Aniel (2016), evaluaron la actividad antimicrobiana de hojas de *Desmodium gangeticum*, para esto ensayaron extractos n-hexano, clorofórmico, metanólico y acuoso, hallando que el extracto metanólico presentó actividad apreciable sobre cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* entre otros. Además en la marcha fitoquímica de la hojas de *D. gangeticum* hallaron alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas y esteroides.

Estudiando las propiedades antidiarreicas de *Desmodium pulchelum*, Rahman et al. (2013) evaluaron la actividad farmacológica en ratas, usando extractos metanólico y éter de petróleo de las hojas de *Desmodium pulchelum*, frente a la diarrea inducida por aceite de ricino. Usando dosis de 200 mg/kg redujeron la severidad de la diarrea entre 28,33% y 31,95% en comparación con la

droga control loperamida que la redujo un 54,75%, concluyendo que tanto el extracto éter de petróleo como el metanólico poseen ingredientes biológicamente activos con actividad antidiarreica.

Por otro lado, Muanda, Soulimani y Dicko (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólico y metanol agua (1:1) de hojas de *Desmodium ascendens* sobre cepas de *E. coli*, *Aspergillus niger*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en disco, concluyendo “que el extracto metanol:agua 1:1 era el más activo sobre estas cepas que el extracto acuoso” (p. 100).

En Ghana, Addy y Dzandu, (1986) reportaron un estudio de actividad anti anafiláctica de extractos acuosos de las partes aéreas de *Desmodium adscendens* en el que “usando diferentes concentraciones de extracto acuoso caliente de *Desmodium adscendens*, los extractos acuosos y etanólicos de *Desmodium adscendens*, administrados por vía oral, redujeron las contracciones anafilácticas, y se opusieron a las contracciones inducidas por la histamina y redujeron la cantidad de sustancia estimulante del musculo liso de los tejidos pulmonares del cobayo” (p.13).

Evaluando la capacidad antioxidante de diez especies de *Desmodium* Tsai et al., (2011), examinaron la capacidad antioxidante de diez especies de *Desmodium*, donde la mayoría mostró actividad antioxidante en los ensayos DPPH, FRAP, ABTS y poder reductor y en especial *D. sequax* especie en la que se halló ácido clorogénico y vitexina a los que se les atribuyó la principal actividad antioxidante.

Respecto al uso de plantas medicinales en el Callejón de Huaylas, Ancash Perú Hammond, et al. (1998), recopilaron información de treinta y tres especies y en la que se reportó el uso de hojas de *D. molliculum* como infusión por su acción antiinflamatoria sobre hígado y riñones, también se reportó que “el uso de una infusión de hojas de esta planta mezclada con *Equisetum bogotense* para el tratamiento de cáncer a la próstata.” (p. 21)

Investigaciones del aspecto fitoquímico de especies de Desmodium

En su evaluación de extractos de semillas y de hojas de *D. canadense* y *D. illinoense* por HPLC y LC/MS en busca de saponinas triterpenoides del tipo oleanano Taylor et al. (2009), hallaron soyasaponina III como principal saponina en extractos metanol-agua 80% que fueron fraccionados mediante el uso de resina macroporosa DIAION HP-20. En los extractos de hojas de *D. canadense* solo se detectó por cromatografía HPLC soyasaponinas I y III en niveles traza.

Anowi, Onyegbule, Onyekaba, y Azode (2012), realizaron un screening fitoquímico de extracto etanólico de hojas de *D. velutinum*. El screening fitoquímico reveló la presencia de resinas, flavonoides, taninos y saponinas y ausencia de esteroides y alcaloides.

Con el propósito de mostrar sus resultados de la “huella dactilar” de extractos de partes aéreas de *Desmodium adscendens* provenientes de cuatro países africanos Ghana, Nigeria, Sierra Leona y Togo, Galand, et al., (2004), de la Universidad de Tours, Francia, presentaron un poster con los resultados del análisis cromatográfico en capa fina sobre silicagel G realizado con el propósito de caracterizar el contenido de flavonoides y saponinas a las que se les atribuye un efecto hepatoprotector, hallando ligeras diferencias entre estas especies. Propusieron su técnica como un medio para medir el valor terapéutico de los extractos de *D. adscendens*.

Investigaciones sobre inducción de hipercolesterolemia en ratas.

El-Sayed, Elrahman, Emara y Abd El-Hafez (2015) presentaron los resultados de su investigación sobre el efecto de la ingesta de aceite de oliva, aceite de coco y mantequilla sobre tejido adiposo hepático y perfil lipídico del suero de ratas albinas Sprague-Dawley, para ello trabajaron con 20 ratas macho y 20 hembras. Se alimentó con dieta estándar por una semana y luego se sacrificó 10 ratas para obtener la línea base. Las ratas restantes fueron divididas en 2

grupos de 15 individuos y luego se formaron grupos de 5 ratas a las que se aplicó la dieta, grupo A aceite de oliva 10%, grupo B aceite de coco 10% y grupo C mantequilla 10%, el tratamiento duró 4 semanas. El resultado mostró que el aceite de coco puede ser considerado hipercolesterolémico, mientras que el aceite de oliva resultó ser de efecto neutro o ligeramente hipocolesterolémico, asociándose estos resultados a la concentración de ácidos grasos saturados, mono-insaturados y poli-insaturados.

En razón de la existencia de diversos esquemas para inducir hiperlipidemia en ratas, Dhande, Gursahani, Kadam (2014), propusieron estandarizar una dieta basada en una suspensión de colesterol y ácido cólico en aceite de coco por 28 días. Trabajaron con 18 ratas macho Sprague-Dawley divididas en 3 grupos, un grupo control otro con dieta suspensión de colesterol 1% y ácido cólico 0,5 % en aceite de coco y el tercer grupo suspensión de colesterol 2% y ácido cólico 1% en aceite de coco, ambas a 2,5 mL/kg, luego del periodo de 28 días evaluó el perfil lipídico y colesterol fecal entre otras pruebas, los resultados se analizaron por Anova seguido por prueba de Dunnet comparándolo con el vehículo (aceite de coco), concluyendo que “la suspensión de colesterol 2% y ácido cólico 1% en aceite de coco a 2,5 mL/kg por 28 días era la más efectiva para inducir hiperlipidemia y sugirieron el uso de este modelo para evaluar la actividad antihiperlipidémica de hierbas o de drogas sintéticas.” (p. 1120).

Cortés et al (2014) trabajaron la inducción de hipercolesterolemia en ratas jóvenes Wistar. Midieron el efecto de dos dietas sobre los niveles de colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL y colesterol LDL, una dieta alta en colesterol y otra alta en ácidos grasos (inductora de obesidad), en periodos de 6 y 12 semanas. La dieta alta en colesterol consistió de pellets para rata enriquecidos con grasa 40% de las kilocalorías, 1,25% de colesterol, ácido cólico 0 %, la dieta inductora de obesidad pellets enriquecidos con grasa 60% de las kilocalorías, caseína y L-Cisteína, y la dieta estándar proteína 26,8 % de la kilocalorías, grasa 16,7 % de las kilocalorías y carbohidratos 56,4 % de las kilocalorías. Concluyeron que “no hubo diferencia significativa entre los tratamientos de dieta alta en colesterol

ni la dieta alta en ácidos grasos respecto a la dieta normal ni en las 6 semanas ni a las 16 semanas de tratamiento, pero si se observó un decrecimiento en niveles de colesterol HDL tanto como una elevación significativa de triglicéridos con los dos tratamientos.” (p. 851). Los autores sugieren que las ratas jóvenes podrían poseer algún mecanismo compensatorio.

Poveda et al (2005), evaluaron el efecto de dietas suplementadas con diferentes aceites vegetales sobre el perfil lipídico de ratas albinas Wistar. Se evaluó el efecto de los aceites de mayor consumo en Colombia (palma, soya, maíz, girasol y cáñola), la dosis empleada fue de 0,2 mL por día de cada aceite. Con 90 ratas se formaron 6 grupos: un grupo control (dieta para roedores Rodentina) sin suplemento y los otros 5 grupos con la adición de 0,2 mL de los respectivos aceites. Se analizó el contenido de tocoferoles, tocotrienoles y ácidos grasos de cada aceite. Finalmente luego de 30 días de tratamiento se analizó colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL. El análisis estadístico de los resultados se hizo por análisis de varianza ANOVA, concluyendo que “los aceites modifican el perfil lipídico aunque en lo que respecta al colesterol total no se hallaron diferencias significativas entre los grupos, además se sugiere que un bajo contenido de ácidos grasos saturados y la presencia de tocoferoles y tocotrienoles en los aceites son favorables para el aumento de colesterol HDL.” (p. 108)

2.2.2. Investigaciones en el Perú

Investigaciones acerca de actividad farmacológica de especies de Desmodium.

En su trabajo de investigación sobre el efecto del extracto etanólico de *D. molliculum* sobre el infiltrado leucocitario en tejido pulmonar de ratones, Acero et al. (2012) evaluaron y midieron la IgE sérica específica de alérgeno (inyección intraperitoneal y nebulización de polvo de ovoalbúmina). Concluyendo en base a los valores de IgE, infiltrado peribronquial y

perivascular en el pulmón, que *D. molliculum* tiene un efecto en la inflamación alérgica similar al obtenido con dexametasona.

Aicardi et al. (2012) evaluaron el efecto diurético de extracto alcohólico de *Desmodium molliculum* “Manayupa” en ratas albinas, concluyendo que el extracto metanólico de *D. molliculum* a la dosis de 400 mg/kg ejerce un efecto diurético superior a la furosemida en la primera hora de tratamiento y similar en el promedio luego de 4 horas de tratamiento.

Acaro (2010), en su trabajo de tesis de maestría evaluó el efecto anticonceptivo y post-coital de extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (HBK). DC. "Manayupa" en ratas hembras cepa Holtzmann, donde se demostró que extractos etanólicos de hojas de *D. molliculum* en dosis de 200 mg, 600 mg y 1000 mg/kg evidenciaron efecto anticonceptivo en ratas hembra de cepa Holtzmann.

Acerca de aspectos fitoquímicos de Desmodium molliculum.

Pérez, et al (2010) de la UPAO realizaron un estudio fitoquímico preliminar de 31 plantas medicinales del norte del Perú mediante ensayos a la gota, entre ellas analizaron muestras de 5 g de las partes aéreas secas y molidas de *D. molliculum* preparando extractos con cloroformo, etanol 96°, agua y HCl 1% y trabajando por maceración en frío por 24 horas, hallando esteroides, taninos, flavonoides, antocianinas y cardiotónicos.

Chang et al. (2009) publicaron sus resultados del screening fitoquímico de *Gentianella alborosea*, *Tiquilia paonychioides* y *Desmodium sp.* Respecto a *Desmodium sp* se trabajó con las partes aéreas secas y molidas y se extrajo con etanol por 48 horas luego se trabajó la marcha fitoquímica y se halló grupos fenólicos libres, taninos, triterpenos y/o esteroides, flavonoides y leucoantociandinas, reportando además ausencia de nafto y antraquinonas, saponinas y alcaloides.

Lozano et al., (2001), demostraron la presencia de metabolitos tales como aminoácidos, compuestos fenólicos, taninos catéquicos, esteroides y/o triterpenoides, flavonoides y leucoantocianidinas en extractos metanólicos de las partes aéreas de esta especie colectadas en tres diferentes localidades y señalando además que “en relación a sus constituyentes químicos principales no existen diferencias cualitativas en la composición de las muestras estudiadas, pero sí respecto al orden de abundancia relativa de los metabolitos secundarios presentes, lo que demuestra la existencia de una variabilidad importante dependiente de las condiciones climáticas y edáficas de las zonas geográficas consideradas.” (p. 44)

2.3. Bases Teóricas

2.3.1. *Desmodium molliculum*

El género *Desmodium* perteneciente a la familia Fabaceae, incluye 350-450 especies que crecen en zonas tropical y subtropical del mundo. Deshpande y Bhalsing, (2014), mencionan que “el nombre *Desmodium* deriva del griego *desmos* cadena y *hode* como, en referencia a la disposición de sus semillas”. (p. 39).

En el Perú tenemos a las especies *Desmodium ascendens* y *Desmodium molliculum* HBK, que es conocida como pata de perro, runa manayupa, pega pega, amor seco, y crece en la sierra de Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco Junin, Lima, La Libertad, Huaraz a alturas de entre 2000 a 3000 msn

Según Loja (2002), las características más saltantes de *D. molliculum*, son: “planta herbácea perenne postrada, tallo acanalado ligeramente rugoso, densamente pubescente. Hojas alternas compuestas peciolo 6-10 mm de longitud, limbo trifoliado, foliolos orbiculares 1-2 x 0,9-2 cm, haz verde más

intenso que el envés. Inflorescencia racemosa, 8-20 cm de largo, 6 a 12 pares de flores, brácteas ovadas orbiculares rojizas, corola papilionada, estambres diadelfos, ovario con 4-6 óvulos. Fruto lomento con 3-6 artejos, cada artejo con una semilla”, (p. 79) .Otras características son descritas por Castañeda y Condori, (2010): “Raíz abundante, penetra profundamente en la tierra por eso resiste a las sequías”.

Esta especie es usada en nuestro país por la medicina tradicional, como diurética, antiinflamatoria, emenagoga, depurador sanguíneo, asma y en el tratamiento de heridas. Estas aplicaciones estarían justificadas por su composición química. siendo la materia médica toda la planta excepto la raíz (Hammond, et al. 1998).

Las investigaciones fitoquímicas realizadas en el género *Desmodium* revelan la presencia de metabolitos secundarios tales como flavonoides, alcaloides, esteroides, saponinas triterpénicas. Existen estudios en el extranjero sobre la fitoquímica de varias especies de interés biológico del género *Desmodium*, como se ve en la Tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos secundarios en especies del género *Desmodium*

Especie	Flavonoide	Saponina	Alcaloide	Referencias
<i>D. ascendens</i> Tallos y hojas	Taninos condensados, quercetrin glucosido, ác. gálico, ác.. protocatecuico, rutina	Soyasaponinas I , II y III Dihidrosoyasaponina I	Hordenina tiramina	Muanda et al. (2011)
<i>D. gangeticum</i> Partes aéreas	5-O-metilgenistein-7-O-β-D-glucopiranosido, rutina, kaempferol	β-sitosterol	N,N-dimetiltriptamina, hordenina, feniletilamina	Ganjhu et al (2014)
<i>D. triflorum</i> Hojas	Vitexina, genistina	Ác ursólico	β- fenetilamina tiramina, hypaforina	Bhosle, (2013)
<i>D. canadense</i> Semillas	-	Soyasaponina III	-	Taylor, (2009)
<i>D. heterocarpon</i> Planta entera	Vitexina	β-sitosterol	-	Huang, et al. (2010)
<i>D. styracifolium</i> Planta entera	Vicenina, isovitexina, genistina, shaftósido (*)	Soyasaponina I Soyasapogenol E (**)	-	(*) Lin, y Kong, (1993) (**) Kubo, et al.,(1989)
<i>D. sequax</i> Planta entera	Ac. Clorogénico, vitexina (*)	β-sitosterol, β-amirina (**)	-	(*) Tsai, et al. (2011) (**) Zhang,et al. (2012)

Fuente. Elaboración propia.

2.3.2. Colesterol, lipoproteínas y metabolismo del colesterol

En Lehninger (2014) se describe al colesterol como el esteroide más común en los tejidos corporales, que juega un rol crucial como componente de la membrana celular y como precursor en la síntesis de hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D. El colesterol es sintetizado principalmente en el hígado y transportado a las células por vía sanguínea por las lipoproteínas plasmáticas principalmente por las lipoproteínas de baja densidad (LDL_c). En Lehninger (p. 816) se describe la biosíntesis del colesterol como un proceso que puede ser dividido en cuatro etapas:

- Condensación de tres unidades acetato para formar un intermediario de 6 carbonos mevalonato, en esta conversión interviene la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa).
- Conversión del mevalonato a unidades de isopreno activado.
- Polimerización de seis unidades isopreno de 5 carbonos para formar escualeno lineal de 30 carbonos.
- Ciclación del escualeno para formar los cuatro anillos del núcleo esteroide con una serie de cambios (oxidaciones, remoción o migración de grupos metilo) para producir colesterol.

En la Figura 1 se muestra un resumen de la biosíntesis de colesterol.

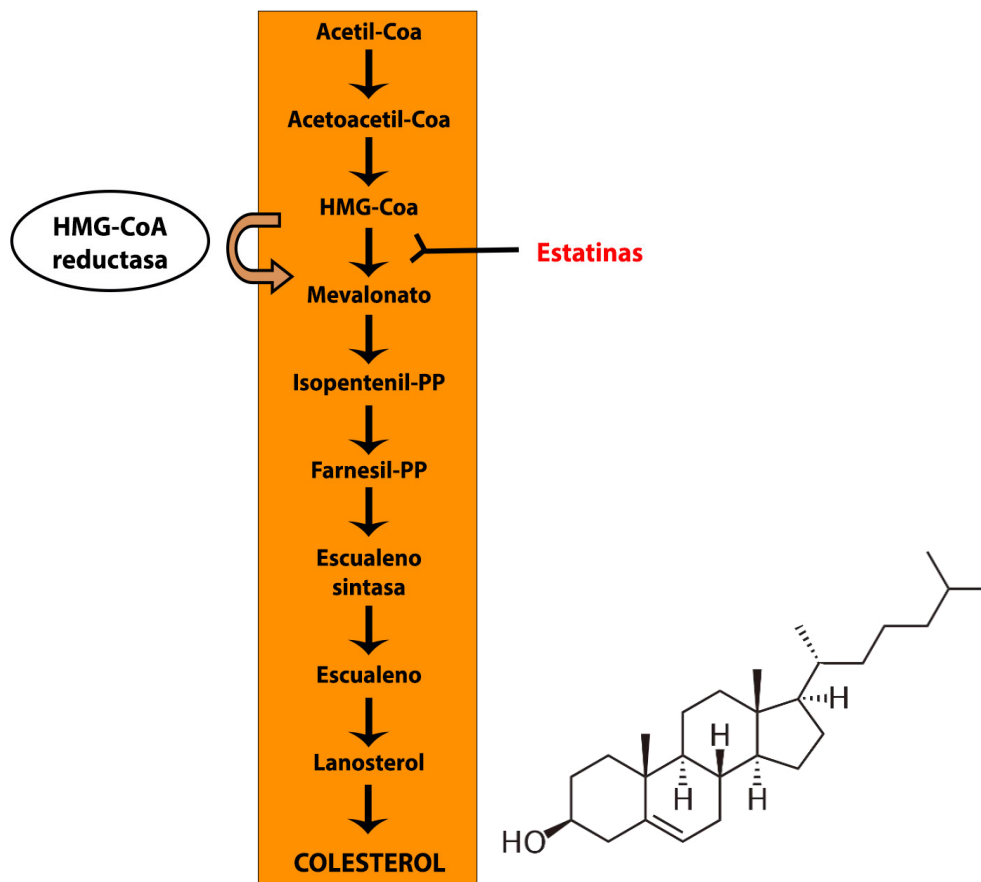


Figura 1. Resumen biosíntesis de colesterol. Tomado de Santana, (2009) (p. 6), y estructura del colesterol tomado de wikipedia (<https://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>)

La homeostasis del colesterol corporal es determinada por la absorción de colesterol, síntesis de colesterol y excreción de colesterol, la pérdida del control de alguno de estos procesos llevará a un incremento del colesterol plasmático como se muestra en la Figura 2.

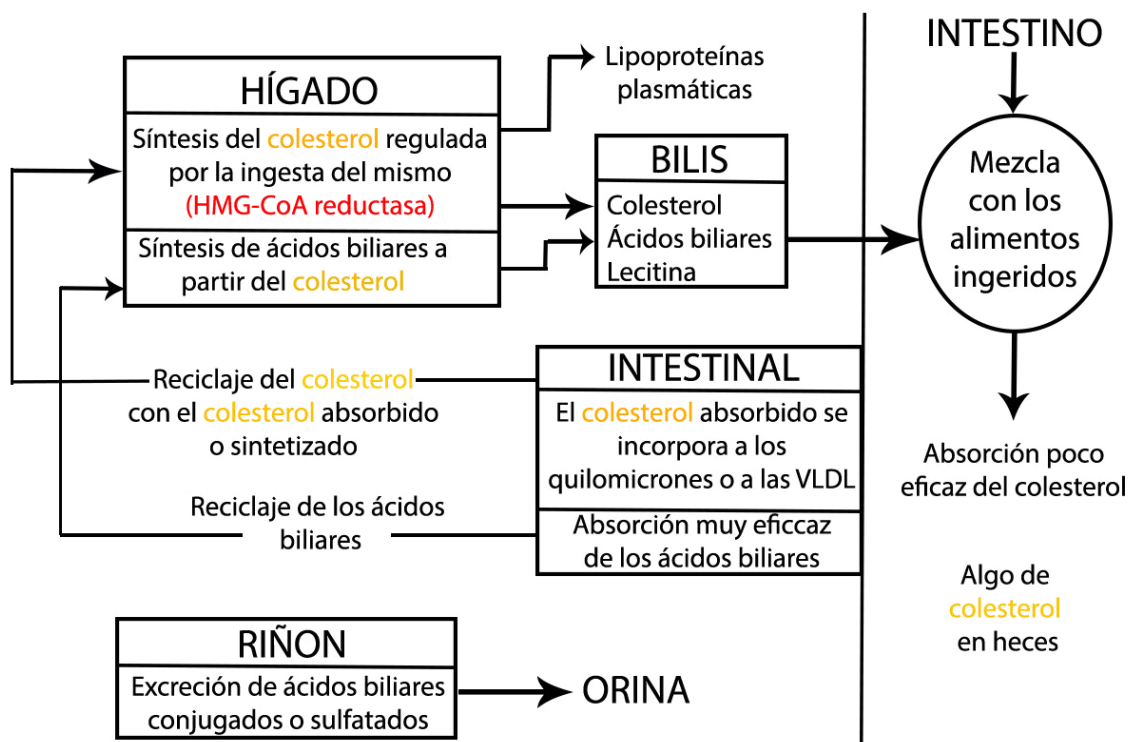


Figura 2. Resumen del metabolismo corporal global del colesterol.

Tomado de Campbell P, Smith A, Peters T. 2007. Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica. 5º ed. Editorial Elsevier. Barcelona. España.

La hipercolesterolemia que se caracteriza por la elevación del colesterol sérico y otros parámetros lípidos (colesterol-LDL y triglicéridos), así en Cardella y Hernández (2007), se menciona que “es una condición metabólica que determina la aparición de los primeros síntomas de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis”. (p. 890).

Lipoproteínas.

Los lípidos deben ser transportados por la sangre hacia los tejidos donde serán almacenados o consumidos, pero la sangre es un medio acuoso y los lípidos son insolubles en medio acuoso, así que deben ser transportados por lipoproteínas plasmáticas. En Lehninger (2014), se define las lipoproteínas como complejos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas (apolipoproteínas), con varias combinaciones de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos como se ve en la Figura 3.

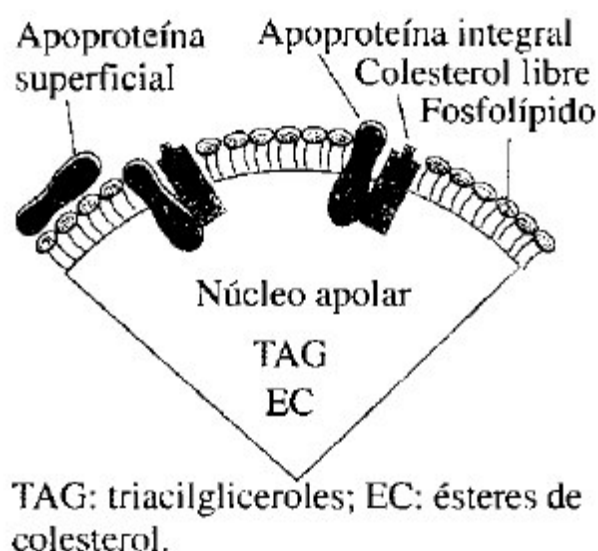


Figura 3. Apolipoproteínas. Tomado de Cardellá y Hernandez 2017(p. 815)

En Lehninger (2014), se describen 4 tipos de lipoproteínas que varían en densidad de acuerdo a su composición de lípidos y proteínas, así tenemos los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL) transportan lípidos desde el hígado a los tejidos extrahepáticos como el tejido vascular, adiposo y

muscular. Los quilomicrones transportan los lípidos ingeridos en la dieta desde el intestino al hígado y tejidos periféricos. En tanto, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) remueven y transportan colesterol desde los tejidos periféricos, de regreso al hígado. En lo que respecta al colesterol y los ésteres de colesterol, estas lipoproteínas transportan diferentes cantidades de ellos. En la Tabla 2, se puede ver las propiedades de las principales lipoproteínas.

Tabla 2. Principales tipos de lipoproteínas del plasma humano y su composición.

<i>Lipoproteína</i>	<i>Densidad en g/mL</i>	<i>Composición % peso</i>				
		<i>Proteína</i>	<i>Fosfolípido</i>	<i>Colesterol libre</i>	<i>Éster de colesterol</i>	<i>Triglicéridos</i>
Quilomicron	< 1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4

Fuente. Tomado de Lehninger, p. 821. 6° Ed.2014. Principios de Bioquímica.

En el trabajo de Bañuls (2012) se describe a las apolipoproteínas como proteínas que cumplen una función estructural, solubilizando los lípidos pero además regulando la ruta metabólica de las diferentes lipoproteínas al servir de cofactores enzimáticos por interaccionar y ser reconocidas por receptores específicos localizados en las membranas celulares, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales tipos de apolipoproteínas de las lipoproteínas del plasma humano.

<i>Apolipoproteína</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Lipoproteína</i>	<i>Función (conocida)</i>
ApoA-I	28 331	HDL	Activa LCAT, interactúa con transportador ABC
ApoA-II	17 380	HDL	-
ApoA-IV	44 000	Quilomicrones, HDL	-
ApoB-48	240 000	Quilomicrones	-
ApoB-100	513 000	VLDL, LDL	Enlaza a receptores para LDL
ApoC-I	7 000	VLDL, HDL	-
ApoC-II	8 837	Quilomicrones, VLDL, HDL	Activa a la lipoproteínlipasa
ApoC-III	8 751	Quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibe a la lipoproteínlipasa
ApoD	32 500	HDL	-
ApoE	34 145	Quilomicrones, VLDL, HDL	Desencadena el aclaramiento de VLDL y de los quilomicrones remanentes.

Fuente. Tomado de Lehninger 6° ed. 2014. Capítulo 21 p. 823

Metabolismo del colesterol

El colesterol, en forma de micela mixta (formada de fosfolípidos y sales biliares) se absorbe en el intestino. Las células intestinales esterifican al colesterol mediante la enzima acilCoA-colesterol-acil-transferasa (ACAT) y se incorpora en los quilomicrones que se forman en la mucosa intestinal. Valenzuela (citado en Santana 2009, p. 8) afirma que “el colesterol que no es esterificado, es nuevamente secretado al lumen del intestino mediante un transportador del tipo ABC (ATP Binding Casette)”. Después que los quilomicrones descargan sus triglicéridos en el tejido adiposo, los remanentes de quilomicrones llevan el colesterol al hígado. Una parte del colesterol del

hígado se secreta en la bilis, tanto en su forma libre como en la de ácidos biliares. Según Blanco (c.p. Santana 2009, p. 8) las LDL son cuantitativamente las principales transportadoras de colesterol; por esto existe correlación directa entre niveles de colesterol total en sangre del humano. La colesterolemia se mantiene dentro de los límites óptimos por constante remoción en todos los tejidos. Para ello, las células disponen de receptores LDL, que captan LDL circulantes y las internan por endocitosis. Los éteres de colesterol son degradados en lisosomas y los productos son liberados en el citosol (Arun Kumar et al. 2013, p. 220), tal como se ve en la figura 4.

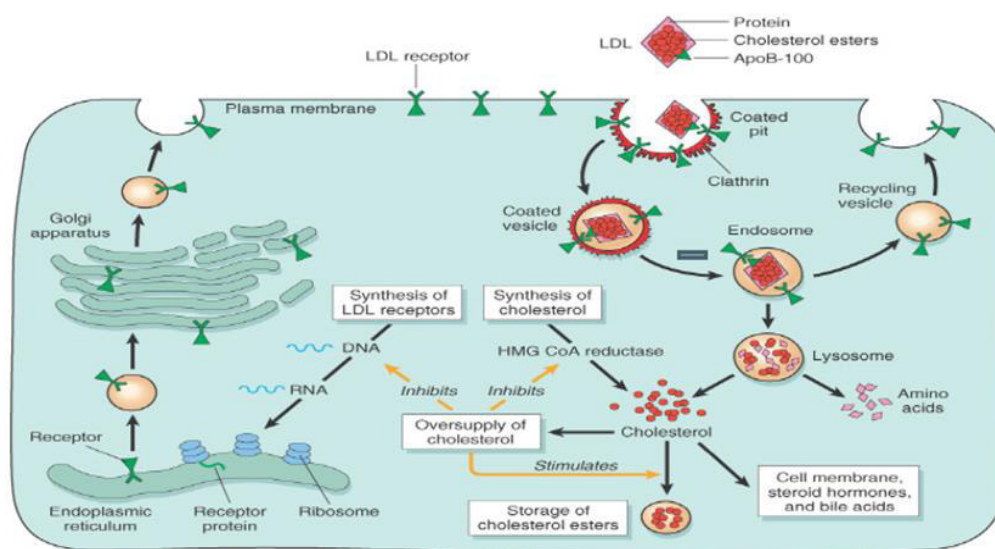


Figura 4. **Metabolismo del Colesterol.** Tomado de Arun Kumar et al (2013) p. 220)

2.3.3. *Ratas como modelo de Hipercolesterolemia*

Numerosas especies animales han sido utilizadas como modelos para investigar la hipercolesterolemia, la lista incluye: conejos (Aliev & Burnstock 1998 p. 797), ratones (Temel, 2007), cerdos y primates (Santos-Gallego et al. 2013). En la tabla 4 se puede observar las características de las especies utilizadas para estudiar hipercolesterolemia.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de diferentes animales de experimentación como modelo de hipercolesterolemia.

	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>	<i>Referencias</i>
Ratones	Bajo costo, de fácil manejo.	Resistentes a desarrollar hipercolesterolemia y aterosclerosis. Dieta hipercolesterolémica les resulta tóxica	Temel y Rudel (2007)
Ratas	Fácil obtención, fácil manejo, existencia de razas con fenotipos dislipidémicos	Generalmente responden poco al colesterol de la dieta	Santos-Gallego, et al. (2013)
Conejos	Tendencia a desarrollar hipercolesterolemia vía colesterol exógeno después de recibir dietas altas en colesterol	Exceden los niveles de hipercolesterolemia hallados en humanos.	Dornas, W. et al (2010)
Cerdos	Al ser alimentados con colesterol los niveles plasmáticos similares al de los humanos.	Altos costos y difícil manejo.	Jawién, J. et al. (2004)
Primates (babuinos y macaco Rhesus)	Similitud genética y fisiológica. Se les puede inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis por dieta alta en colesterol	Elevado precio, escasa disponibilidad, problemas éticos.	Taylor et al. (citado por Santos Gallego, 2013)

Fuente. Elaboración Propia.

Yin et. al (2012) afirman que las ratas constituyen un modelo práctico para estudiar la hipercolesterolemia, no obstante que presentan algunas características distintas a los humanos, por ejemplo “no expresan proteína de transferencia de ésteres de colesterol CEPT” (p. 52). CEPT es una enzima que transfiere ésteres de colesterol de HDL a VLDL y LDL en intercambio por triglicéridos. Además en plasma de ratas predominan las HDL que es la forma principal de transporte de colesterol, y carecen de Apo(a) y, por tanto de Lp(a) y de Apo D.

Por otro lado Navarro et al., (2005) afirman que “otra característica de este animal es que el metabolismo del colesterol a ácidos biliares se ve incrementado por el aumento del consumo de colesterol en la dieta, mientras que en otras especies experimentales y en humanos este incremento compensatorio de la eliminación del colesterol no se produce, siendo este proceso el principal responsable de su resistencia para experimentar hipercolesterolemia” (p. 85). Otra característica a tenerse en cuenta es la que mencionan Santos-Gallego, et al. (2013), “la hipercolesterolemia en ratas solo puede inducirse (y en escasa cuantía) con dietas muy ricas en colesterol y grasas que contengan además ácido cólico y tiouracilo. El ácido cólico actúa incrementando la absorción de colesterol y suprimiendo la actividad de la 7 α -hidroxilasa (la enzima limitante en la síntesis de ácidos biliares, es decir en la excreción del colesterol) el tiouracilo actúa induciendo hipotiroidismo clínico, que reduce el número y la actividad de LDR-L hepáticos (lo que conduce a un incremento en la concentración de LDL)”. (p. 5)

Matos, et al. (2005) investigando dietas inductoras de hipercolesterolemia, manifiesta que “aunque la cuestión del valor calórico de las dietas para inducir hipercolesterolemia no ha sido muy considerado, pese al alto contenido de grasa de las dietas inductoras, lo cual es la estrategia para inducir la hipercolesterolemia, esto puede llevar a baja ingestión y por tanto a malnutrición” (p. 204). Para superar estos inconvenientes Matos, et al propusieron una dieta que contenía 25% de aceite de soya 1% de colesterol, 13% de fibra (celulosa) y 4 538,4 Kcal/Kg, la que llevó a un incremento en LDL-C y a un decremento en la fracción HDL-C.

Por otro lado Manting, et al. (2011) mostraron que “una combinación de estrés y dieta alta en grasa (83,25% alimento basal, 10% de manteca, 1,5% de colesterol, 0,2% sodio taurodeoxicolato, 5% de azúcar y 0,05% de propiltiouracilo) podía inducir desorden metabólico lipídico en ratas Wistar y proclamaron que su modelo multifactorial es el que mayor semejanza presenta con las características presentadas en seres humanos”. (p. 4)

Marques et. al (2016) afirman que las cepas de ratas Wistar o Sprague-Dawley suelen ser los roedores estándar para experimentos de obesidad

inducida por dieta alta en grasa. Aunque cabe mencionar que en su trabajo encontraron resultados contradictorios en lo que respecta a los valores de triglicéridos y colesterol total tras 17 semanas de tratamiento, “hallando valores más altos de triglicéridos y colesterol en las ratas Wistar que en las Sprague-Dawley” (p. 2).

Las ratas Holtzman que usamos en nuestro trabajo, pertenecen a una línea que proviene de la cepa Sprague-Dawley.

En la Tabla 5 se muestran algunos datos del perfil lipídico normal en ratas Sprague-Dawley según la edad.

Tabla 5. Valores de referencia en suero de ratas macho Sprague-Dawley

<i>Parámetros</i>	<i>5 -8 semanas</i>	<i>9 -14 semanas</i>	<i>15 – 22 semanas</i>
Colesterol total mg/dl	44,8 – 96,9	40,3 – 84,7	52,2 – 95,7
Triglicéridos mg/dl	26,7 – 99,9	44,8 – 119,8	52,2 – 215

Fuente. Adaptado de León et al., (p. 5)

2.3.4. Agentes Hipolipemiantes

Según Robles, Hernández y Fonte, (1999) “los pilares fundamentales en los que se sustenta el tratamiento de las hiperlipemias son: la dieta, el control de la enfermedad causal (obesidad, diabetes mellitus, hipotiroidismo) y los medicamentos hipolipemiantes” (p. 466).

Para Kumar, et al. (2013), “los hipolipemiantes sintéticos son varias clases de drogas que incluyen las estatinas los fibratos, el ezetimibe, los secuestrantes de ácidos biliares y el ácido nicotínico . Estas drogas difieren entre sí en cuanto a su mecanismo de acción y al grado y tipo de modificación del perfil lipídico” (p. 227). Tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Drogas hipolipemiantes sintéticas y sus acciones.

<i>Droga</i>	<i>Mecanismo de acción</i>	<i>Efectos adversos</i>	<i>Efecto sobre lípidos</i>
Inhibidores de la HMG-CoA reductasa:	Disminuye la síntesis de colesterol por inhibición de la HMG-CoA reductasa	Eleva la transaminasa sérica.	LDL ↓
a) Lovastatina (10-80 mg)		Dolor muscular.	HDL ↑
b) Simvastatina (5-40 mg)		Miopatía.	TG ↓
c) Atorvastatina (10-80mg)			
d) Rosuvastatina (5-20 mg)			
Secuestrantes de ácidos biliares:	Disminuye la absorción de bilis.	Sabor desagradable.	LDL ↓
a) Colestiramina (4-16 mg)	Incrementa la conversión hepática de colesterol a ácidos biliares.	Causa flatulencia.	HDL ↑
b) Colestipol (5-30 mg)	Aumenta receptores LDL en hepatocitos	Interferencia con algunas drogas.	TG no afectado aunque en algunos podría aumentar
Derivados del ácido fíbrico:	Aumenta la actividad de la lipoproteínlipasa.	Rash cutáneo.	LDL ↓
a) Gemfibrozil (1200 mg)		Eosinofilia.	HDL ↑
b) Benzafibrato (600 mg)	Disminuye la liberación de ácidos grasos de tejido adiposo.	Impotencia.	TG ↓
c) Fenofibrato (200 mg)		Contraindicado en embarazo.	
Ácido nicotínico (2-6 g)	Disminuye producción de VLDL.	Marcado enrojecimiento.	LDL ↓
	Disminuye lipólisis en adipocitos.	Calor.	HDL ↑
		Comezón.	TG ↓
Ezetimibe	Inhibe la absorción del colesterol intestinal y biliar. Bloquea selectivamente la proteína NPC1L1		LDL ↓

Fuente. Tomado de "A review of hiperlipidemia and medicinal plants", por Kumar et al., 2013. *Int.J.A.PS.BMS*, vol.2 (4), p. 228.

Las drogas sintéticas suelen ser la primera elección en el tratamiento farmacológico y prevención de la hipercolesterolemia, pese a que se conocen sus efectos adversos, por esta razón, en el tratamiento no farmacológico se ha ensayado muchas plantas y sus derivados por su acción hipolipidémica. Entre las plantas ensayadas Kumar, et al., (2013) menciona a *Whitania somnifera*, *Moringa oleífera*, *Psidium guajava*, y Lakhne y Gupta (2015) mencionan a *Allium sativum*, *Allium porrum*, *Cucumis melo*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Nasturtium officinale*, entre otras. Entre los derivados de plantas medicinales que se han estudiado por su actividad hipolipemiente tenemos dos tipos de metabolitos: flavonoides y triterpenoides (fitoesteroles y saponinas).

Respecto a los flavonoides hay estudios con isoflavonoides como genisteína y daizeína y su efecto hipocolesterolémico, así Borradaile, et al. (2002) mostraron que “el efecto hipocolesterolémico de estos isoflavonoides se debería a que inhiben tanto la secreción de ApoB como la síntesis de colesterol, la actividad de ACAT, la actividad y expresión de MTP y por otro lado elevan la expresión de receptores LDL”(p. 538) . De otro lado en su revisión sobre flavonoides y sus metabolitos en la prevención de enfermedades cardiovasculares Zeka et al (2017), mencionan a “los flavonoides kampferol, naringenina, miricetina y (-)-epigallocatequin-galato, como inhibidores de la actividad de la HMGC_oA reductasa donde se deduce que el probable mecanismo sea la unión competitiva al sitio de unión del cofactor de la reductasa ejerciendo un impedimento estérico a la unión con HMGC_oA” (p. 7), lo cual fue corroborado en el estudio de Islam, Sharma et al (2015).

Respecto a los fitoesteroles (esteroles vegetales EV) y saponinas, representan un grupo de compuestos alcohólicos que pertenecen a la familia de triterpenos, como podemos ver en las Figuras 5 y 6.

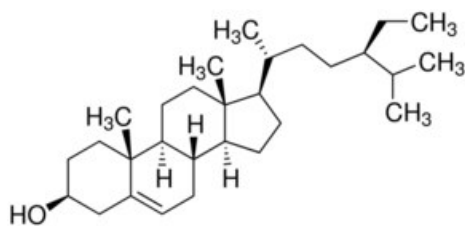


Figura 5. **β -sitosterol** (tomado de catálogo Sigma-Aldrich)

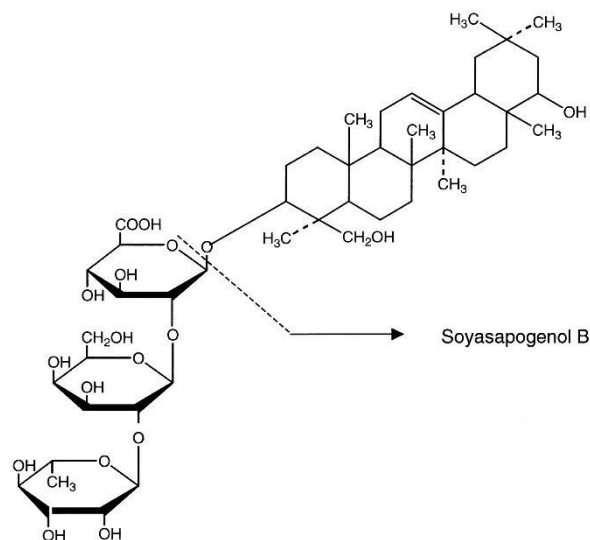


Figura 6. **Soyasaponina I y soyasapogenol B.** Tomado de Soyasaponin I and soyasapogenol B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavailability in women”, por J. Hu, et al., 2004, *The Journal of Nutrition*, vol. 134 (8).

Turnham, (1999, c.p. Bañuls, 2012) afirma que los aceites vegetales son los mayores contribuyentes a la ingesta de esteroides vegetales. En su tesis de doctorado Bañuls hace hincapié en que la principal vía de eliminación del colesterol del organismo es el fallo o la disminución de la reabsorción intestinal. Valenzuela y Ronco (2004 c.p. Bañuls, 2012), mencionan que los fitosteroides ejercen su efecto hipocolesterolémico probablemente en tres niveles:

- a) Inhiben la absorción de colesterol a nivel intestinal, tanto del procedente de la dieta como del de origen biliar.
- b) Inhiben la re-esterificación del colesterol a nivel de la actividad de la ACAT.

c) Aumentan la actividad y expresión del transportador de tipo ABCG5/G8, acelerando el eflujo de colesterol desde las células intestinales al lumen intestinal. (p.20)

Estos mecanismos están resumidos en la Figura 7.

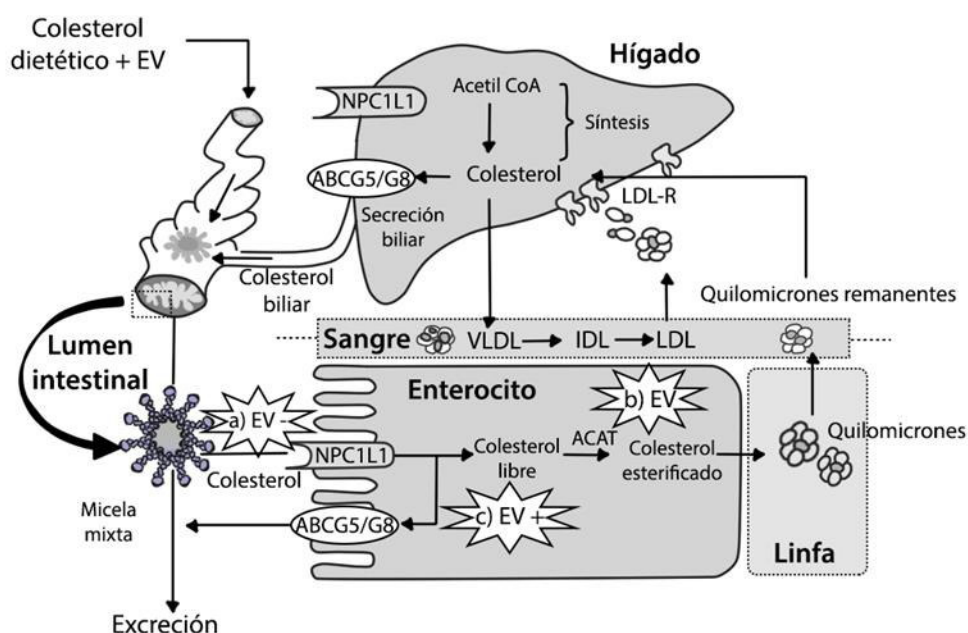


Figura 7. Mecanismos y niveles de acción hipocolesterolémica de los esteroides vegetales. Tomado de “Esteroides Vegetales en bebidas lácteas: efecto sobre el perfil lipídico y estimación de su biodisponibilidad”, por C. Bañuls Morant, 2012. Tesis Doctoral Facultad de Farmacia Universidad de Valencia. p. 22.

Las saponinas, son glicósidos triterpénicos de interés biológico. En un artículo de revisión Kang, nos recuerda que el efecto hipocolesterolémico de las soyasaponinas es conocido ya de muchos años atrás. Oakenfull (1981 c.p. Kang, 2005) menciona dos mecanismos mediante los cuales las saponinas pueden afectar el metabolismo del colesterol:

- Algunas saponinas con características estructurales particularmente definidas, forman complejos insolubles con el colesterol. Cuando este proceso

de formación del complejo ocurre en la luz de los intestinos, se inhibe la absorción intestinal tanto del colesterol exógeno como del endógeno.

- Las saponinas pueden interferir con la circulación entero-hepática de ácidos biliares por formación de micelas mixtas. La reabsorción de ácidos biliares del íleon terminal es bloqueada efectivamente. (p. 8125)

Los conceptos vertidos apoyarían la hipótesis de una probable actividad hipocolesterolémica del extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* HBK, puesto que en investigaciones previas la marcha fitoquímica ha mostrado la presencia de polifenólicos.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y Diseño de Investigación

3.1.1. *Tipo investigación*

La investigación fue de tipo experimental.

3.1.2. *Método y Diseño de Investigación*

Se empleó metodología cuantitativa, el diseño fue experimental.

3.2. Muestra

3.2.1. *Población y muestra vegetal*

3.2.1.1 Población. Hojas frescas de la especie vegetal *Desmodium molliculum* colectadas en el distrito de Baños del Inca en Cajamarca en un lugar con las coordenadas latitud: -7.116012 7°6'57.902"S, longitud: -78.446380 78°26'46.788" E, la altura fue de 2 776 m sobre el nivel del mar, se recolectó en época de floración en el mes de abril del 2013, como se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Recolección de la muestra por el autor, en el distrito de Baños del Inca Cajamarca Fuente propia, 2013.

La clasificación sistemática se realizó usando el sistema de clasificación de Cronquist 1981, la cual se hizo en el Museo de Historia natural de la UNMSM. Vea el certificado de especie (anexo I). En la Figura 9 se muestra las partes aéreas de la planta.

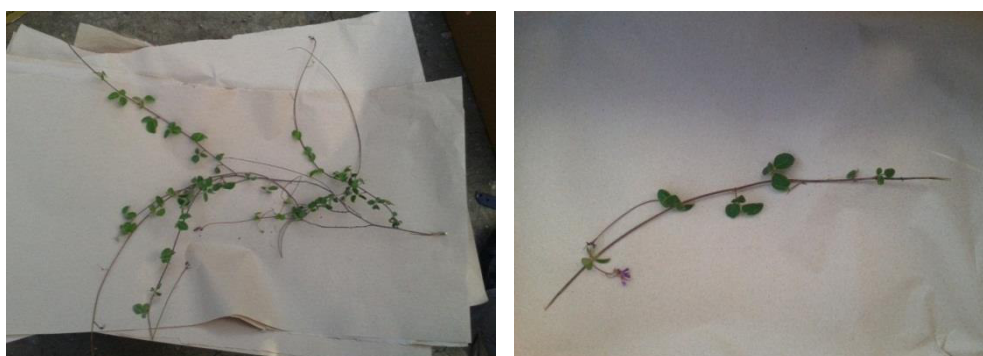


Figura 9. Partes aéreas de la especie *D. molliculum* HBK DC colectada en el distrito de Baños del Inca. Fuente propia, 2013

3.2.1.2 Muestra vegetal. La muestra vegetal fue extracto alcohólico seco de hojas de *D. molliculum*. El extracto se obtuvo por maceración de las hojas con etanol 95% y el extracto se concentró en evaporador rotatorio.

3.2.2. Población y muestra animal

3.2.2.1 Población. Se usó ratas albinas cepa Holtzmann provenientes del bioterio de la UNA La Molina elegidas aleatoriamente entre individuos machos de 8 semanas de vida.

3.2.2.2 Muestra animal. Se utilizaron 34 ratas albinas Holtzmann provenientes del bioterio de la UNA La Molina. Las ratas fueron mantenidas en Jaulas plásticas en condiciones adecuadas de aire temperatura y humedad en el Bioterio del laboratorio de Farmacología de la Fac. de Medicina Humana de UNMSM. Tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentadas con pellets de alimento balanceado para ratones adquirido en la UNALM.

3.3. Procesamiento de las muestras

Se utilizaron 36 ratas albinas Holtzman provenientes del bioterio de la UNA La Molina. Las ratas fueron mantenidas en Jaulas plásticas en condiciones adecuadas de aire temperatura y humedad (Bioterio del laboratorio de Farmacología de la Fac. de Medicina Humana de UNMSM).Tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentadas con pellets de alimento balanceado para ratones adquirido en la UNALM.

3.3.1. Acondicionamiento del material vegetal

Las hojas de *D. molliculum* fueron limpiadas y luego lavadas con agua, se dejaron secar a la sombra luego se desecaron en estufa de aire circulante Memmert a 40°C por 48 horas hasta una humedad de 8%. Las hojas secas se

molieron en molino de cuchillas hasta polvo fino (1,5 – 0,8 mm de diámetro) y se almacenó en frascos de vidrio ámbar con tapa hermética.

3.3.2. *Obtención del extracto etanólico*

Un kg del polvo seco de la droga se maceró con 5 litros de etanol de 96° con agitación por una semana, repitiéndose el proceso con otros 3 litros de etanol de 96°. El extracto se filtró y luego se llevó a concentrar en el evaporador rotatorio y finalmente se terminó de secar en bandeja de vidrio en estufa a 37°C. El extracto seco se almacenó en frasco de vidrio ámbar herméticamente cerrado, en refrigeración hasta su uso en el estudio fitoquímico y la prueba biológica.

3.4. Estudio Químico

3.4.1. *Marcha fitoquímica preliminar*

La marcha fitoquímica preliminar se realizó de acuerdo a la metodología de Lock, (1994). Porciones de 10 mg de extracto se sometieron a los siguientes ensayos: prueba de tricloruro férrico, prueba de Shinoda, prueba de Dragüendorff , prueba de la gelatina, prueba de la espuma, prueba de Lieberman-Burchard.

3.4.2. *Estudio cromatográfico*

Para realizar el análisis cromatográfico, se usó 2,0 g del extracto alcohólico seco se suspendió en agua y se fraccionó por extracción líquido-líquido sucesiva con éter de petróleo, acetato de etilo y finalmente con n-butanol. Los extractos fueron concentrados en evaporador rotatorio. Se trabajó con la fracción acetato de etilo (fr. AcOEt) y la fracción n-butanol (fr. n-BuOH). La

fr. AcOEt se destinó para el análisis de flavonoides, mientras que en la fr. n-BuOH se investigó flavonoides y también la presencia de saponinas.

Para el análisis se usó cromatoplasacas de aluminio de silicagel G F254 de 20 x 20 cm y 0,25mm de espesor. Para la visualización y seguimiento de las distintas cromatografías se usó luz UV a 365nm y como reveladores vapores de amoníaco, reactivo de Neu (difenilborinato al 1% en metanol) seguido de solución alcohólica 3% de polietilenglicol PEG 400), reactivo de Lieberman y H₂SO₄ etanólico al 20% y al 30% y como patrones de isoflavonoides daizeina y genisteina, el flavonoide vitexina y para las saponinas se usó un extracto metanólico al 80% de harina de semillas de soya desengrasada. El procedimiento se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Cromatografía de las fracciones del extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* HBK. Fuente elaboración propia

Adicionalmente, porciones de la fr. AcOEt y de la fr. n-BuOH del extracto alcohólico seco se suspendió en metanol:agua 50:50 y se realizó una extracción en fase sólida según Soto, et al. (2012) y basándonos también en el trabajo Kledjus, Trinácty, Hrdlicka y Kuban (2001), sobre separación de isoflavonas. Empleamos la resina Diaión HP-20, eluyendo con gradiente de agua metanol desde MeOH: H₂O 50:50 hasta 100% de metanol, tal como se muestra en la figura 11.



Figura 11. Extracción en fase sólida con resina Diaion HP20. Fuente propia.

El análisis cromatográfico se realizó a los eluatos MeOH:H₂O 50:50, 60:40 70:30 80:20, 90:10 y MeOH 100%. También se realizó un barrido espectral de 200-400 nm en espectrofotómetro Thermos, a cada uno de los eluatos.

3.4.2.1 Análisis cualitativo de flavonoides. El análisis se enfocó en comprobar la presencia de isoflavonoides tanto en la fr. AcOEt como en la fr. n-BuOH. Se utilizó como fase móvil el sistema Acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua 100:11:11:26, cloroformo:acetato de etilo 1:1 y cloroformo:metanol 10:1 según Galand (2004).

3.4.2.2 Fraccionamiento de flavonoides y saponinas. El fraccionamiento de los extractos n-BuOH y AcOEt se realizó con la finalidad de obtener fracciones concentradas tanto de isoflavonoides como de saponinas. La separación se realizó mediante la técnica de extracción en fase sólida de fase reversa Soto, (2002); Taylor, (2009), Berhow, (2002). Se llevó a cabo mediante extracción en fase sólida de los extractos AcOEt y n-BuOH utilizando la resina Diaion HP-20 y usando mezclas MeOH/H₂O en gradiente para la elución de las respectivas fracciones. Se tomó 100 mg de extracto seco y se disolvió con 10 mL de solución de MeOH al 50% en agua, y se aplicó lentamente a la columna de Diaion HP 20. La columna de resina previamente se acondicionó haciendo pasar lentamente 10 mL de MeOH, seguido de 10

mL de agua. La muestra una vez adsorbida es luego lavada con 10 mL de mezcla MeOH:H₂O 50:50, luego se procedió a la elución de la columna con mezclas MeOH:H₂O en gradiente, obteniéndose de esta forma los eluatos correspondientes a MeOH:H₂O 60:40 , MeOH:H₂O 70:30 , MeOH:H₂O 80:20 , MeOH:H₂O 90:10 y MeOH 100%. Paralelamente se trató de la misma forma el extracto n-BuOH de semillas de soya para usarlo como patrón de presencia de isoflavonas y de soyasaponinas.

Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina analítica y preparativa de silicagel G para investigar isoflavonoides cualitativamente y por sus espectros UV. La fracción eluída con MeOH: H₂O 80:20 y MeOH:H₂O 90:10 se usaron para la cromatografía preparativa de isoflavonoides. La fracción MeOH 100% se usó para el análisis cualitativo de saponinas.

3.4.2.3 Análisis cualitativo de saponinas. El análisis se enfocó en comprobar la presencia de soyasaponinas en el extracto n-BuOH. Se usó el extracto n-BuOH y el eluato MeOH 100% de la extracción en fase sólida y se usó como referencia extractos de harina de soya por está documentado que poseen soyasaponinas (Fenwick y Oakenful 1981) . El análisis se realizó por cromatografía en capa fina sobre silicagel G. La fase móvil fue cloroformo:metanol:agua 65:25:4 y también con n-BuOH:Etanol:amoníaco 15N, 7:2:5), Oleszek, (2002); Wolf, (1970), y el revelado se hizo con H₂SO₄/EtOH 20% y 30% más calor 105 °C, también se usó como revelador el reactivo Lieberman-Bouchardat y calor 105°C , Popescu, et al, (2009).

3.4.2.4 Cromatografía en capa fina Preparativa. Guiados por los resultados de la cromatografía analítica y usando las fracciones de la extracción en fase sólida correspondientes: del extracto n-BuOH la fracción MeOH:H₂O 80:20 y la fracción MeOH:H₂O 90:10 se realizó la cromatografía en capa fina preparativa con el fin de realizar el análisis por espectrofotometría UV en busca de isoflavonoides. Se trabajó con cromatoplasas de silicagel G y como fase móvil se usó AcOEt:ác fórmico:AcOH:H₂O (100:11:11:26).

3.4.3. Elucidación estructural mediante espectrofotometría UV

Se llevó a cabo con el propósito de confirmar la presencia de compuestos de tipo isoflavonoide. Se trabajó con el raspado de las manchas de la cromatografía en capa fina preparativa correspondiente a la fracción n-BuOH eluida con MeOH:H₂O 80:20 y con las correspondientes a la del extracto AcOEt eluidas con MeOH:H₂O 90:10, tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la cromatografía preparativa de los eluatos

<i>Eluato</i>	<i>Mancha</i>	<i>Valores R_f</i>
MeOH : H ₂ O (80 : 20)	n-But-sup	0,95
	n-But-sup-2	0,72
	n-But-Rf-2	0,66
	n-But-Rf-3	0,47
MeOH : H ₂ O (80 : 20)	AcOEt ^{sup}	0,37
	AcOEt ^{inf}	0,30

Fuente. Elaboración propia.

Las manchas obtenidas para el eluato MeOH:H₂O 80:20 se den

Estas manchas fueron raspadas y luego extraídas con MeOH y los extractos filtrados se leyeron en un espectrofotómetro Thermo Evolution en modo UV de barrido (de 200-400 nm). Los picos de absorción de las fracciones AcOEt^{sup}, AcOEt^{inf} y n-BuOH^{sup} 2, nos permitieron proponer las estructuras isoflavonoide por comparación con las tablas de referencia según Mabry (1970).

3.5. Ensayos Biológicos: Efecto hipocolesterolémico del extracto etanólico de hojas de *D. molliculumm*.

3.5.1. Condiciones previas a las series experimentales

La población fue de 34 ratas albinas Holtzman del bioterio de la UNALM, con pesos entre 205 ± 20 g que fueron instaladas en el bioterio de Farmacología de la Facultad de Medicina, sometidas a un periodo de adaptación de 5 días con agua a libertad y pellets de alimento balanceado para ratas de la UNALM, y a una temperatura y humedad controladas (23-26 °C y humedad 60-70%).

3.5.2. Diseño experimental

La inducción de la hipercolesterolemia se hizo basándonos en la metodología seguida por Ruiz-Roso (s.f. c.p. Arroyo, 2007 y c.p. por Salazar, 2003), con modificación sugerida por el Dr. Arroyo, J.. Se trabajó con 34 ratas en dos periodos:

Periodo 1: periodo de elevación de la lipemia en ratas albinas Holtzmann por dieta hipercalórica y alta en colesterol (dieta hipercolesterolémica).

Periodo 2: tratamiento

- **Periodo 1:** la población de 34 ratas se dividió en dos grupos, uno de 12 individuos (dieta normal) y otro de 22 individuos (dieta hipercolesterolémica), se pesaron y se colocaron en jaulas colectivas de 6 individuos bajo condiciones ambientales controladas, ciclos de luz oscuridad de 12 horas y temperatura 18-22 °C. El grupo dieta normal (12 individuos), con agua y alimento balanceado a libertad, se le administró 1,5 mL de suero fisiológico. El grupo dieta hipercolesterolémica (24 individuos) con agua y alimento balanceado a libertad y una dosis de colesterol disuelto en aceite de oliva de 200 mg/kg de peso corporal administrada mediante sonda bucoesofágica.

Se trabajó así por un periodo de cuatro semanas, al final del cual se tomó al azar 6 individuos del grupo dieta normal y 6 individuos del grupo dieta hipercolesterolémica y la sangre se obtuvo por punción cardíaca bajo anestesia superficial con éter, y luego fueron sacrificadas por sobre exposición al éter.

- **Periodo 2:** Las 22 ratas restantes luego del periodo 1, se agruparon en 4 grupos 2 de 6 individuos y dos de 5 individuos para el tratamiento respectivo. Las dosis se administraron usando como vehículo carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5%:

Grupo 1: 6 ratas con dieta normal (control normal),

Grupo 2: 6 ratas con dieta hipercolesterolémica (control negativo),

Grupo 3: 5 ratas con dieta hipercolesterolémica más tratamiento con extracto etanólico seco de hojas de *D. molliculum* 500 mg/kg peso corporal,

Grupo 4: 5 ratas con dieta hipercolesterolémica más tratamiento con droga de referencia atorvastatina 2 mg/kg peso corporal

Este periodo 2, tuvo una duración de 30 días, luego del cual se tomó muestra de sangre a los 24 individuos. Las muestras de 5 mL se recibieron en tubos con anticoagulante.

La determinación del perfil lipídico se llevó a cabo en el Servicio de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM mediante el método enzimático de punto final.

El porcentaje de reducción de la concentración del colesterol total se calculó utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{Concent. de colest total de control positivo} - \text{Concentración de colest.total tratamiento}}{\text{Concent.colest total control positivo}} \times 100$$

3.5.3. *Análisis de los resultados*

Con los datos obtenidos para cada grupo se obtuvo las medias y los principales parámetros estadísticos descriptivos. Se evaluó la eficacia de la inducción de hipercolesterolemia mediante la prueba t de Student. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk), la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene, y se hizo el análisis de varianzas por Anova unidireccional seguido de una prueba de Tukey. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación de resultados

4.1.1 *Marcha fitoquímica preliminar*

Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la marcha fitoquímica.

<i>Reactivos</i>	<i>Resultados</i>	<i>Presencia de:</i>
Tricloruro férrico	++	Polifenoles
Shinoda	++	Flavonoides
Draguendorf	+	Alcaloides
Gelatina	+++	Taninos
Espuma	++	Saponinas
Lieberman	++	Saponinas

Nota. (-) ausencia, (+) presencia de trazas, (++) presencia moderada, (+++) presencia abundante. *Fuente.* Elaboración Propia.

Los resultados nos muestran la presencia abundante de taninos, presencia moderada de flavonoides y saponinas y trazas de alcaloides.

4.1.2. Estudio cromatográfico

4.1.2.1 Confirmación de presencia de flavonoides por cromatografía CCD del extracto etanólico de hojas de *D. molliculum* fraccionado por partición.

El estudio evidenció la presencia de diferentes flavonoides en el extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* (HBK) DC, tal como se ve en los cromatogramas mostrados en las figuras 12, 13 y 14. La presencia de flavonoides se evidenció al observar bajo la luz UV de 365 nm después de aplicar vapores de amoníaco, en la que se ve manchas de tono púrpura oscuro (figura 17), que luego al ser reveladas con el reactivo de Neu cambiaron a colores amarillo (flavonas), anaranjado, verde (flavonoles), blanco-celeste (isoflavonas), vea figura 18 y 19. Según Mabry T. el color de las manchas es un indicativo del tipo de flavonoide, como se puede ver en la Tabla 9.

Tabla 9. *Revelado de flavonoides en cromatografía en capa delgada.*

<i>Agente revelador</i>	<i>Color</i>	<i>Tipo de fenólico o flavonoide</i>
Luz UV 366	Azul No detectable	Ácidos fenólicos Isoflavonoides
Luz UV + vapores NH ₃	Púrpura oscuro Azul-blanco fluorescente	Flavonoles, flavonas, flavononas
Reactivo de Neu + PEG + luz UV 366	Amarillo Naranja Verde Celeste blanco	Flavonoles, flavonas, flavononas Flavonoles Flavonoles, flavonas Isoflavonas

Fuente: Tomado de Mabry (1970)

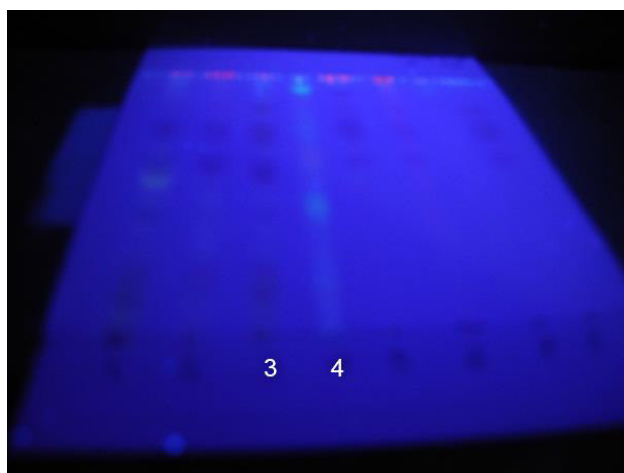


Figura 12. Cromatografía en capa delgada de extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* y de sus fracciones comparada con extracto metanólico de harina de soya, bajo luz ultravioleta 365 nm mas vapores de amoníaco. 3 indica fracción n-BuOH del extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* y 4 fracción n-BuOH de harina de semillas de *G. max* (soya). En el carril 4 se ve las manchas correspondientes a isoflavonoides de semillas de *G. max*. El carril 3 muestra manchas correspondientes a la fracción n-BuOH del extracto alcohólico de *D. molliculum*. Fase fija: silicagel G y fase móvil AcOEt:ác.fórmico:ác. acético: agua (100:11:11:26) . *Fuente:* Elaboración propia.

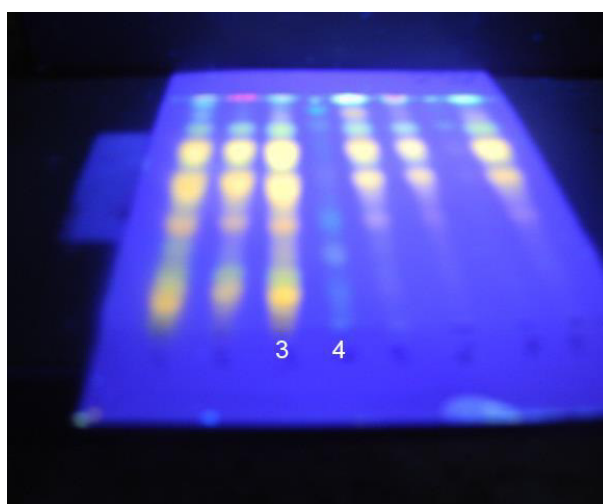


Figura 13. Cromatografía de flavonoides revelado con reactivo de Neu (difenilborinato etanolamina al 1% metanólico + PEG) y luz UV 366nm, donde (3) es fracción n-BuOH del extracto etanólico de *D. molliculum* , (4) fracción n-BuOH del extracto metanólico de harina de soya (*G. max*) *Fuente:* Danilo Barreto. Fase fija: silicagel G y fase móvil AcOEt:ác.fórmico:ác. acético: agua (100:11:11:26)

4.1.2.2 Investigación tipo de flavonoides por cromatografía CCD del extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*. La búsqueda se enfocó en demostrar la presencia de algunos flavonoides previamente reportados en otras especies del género *Desmodium*, como vitexina en *D. adscendens* (Pothier), y en *D. sequax* (Jen-Chieh Tsai 2011) e isoflavonoides en *D. gangeticum* (Patil, 2016) y en *D.*

heterocarpon (Huang, 2010). Nosotros detectamos la posible presencia de vitexina en el extracto etanólico de hojas de *D. molliculum* al correr el extracto junto con vitexina patrón mostrando una mancha con las mismas características de color y valor Rf que el patrón, tal como se muestra en la Figura 14. La búsqueda de isoflavonoides dio como resultado en el extracto etanólico, manchas con características similares a los de la referencia extracto metanólico de semillas de soya, es decir fluorescencia blanco celeste al revelar con vapores de amoníaco y bajo luz UV de 365 nm y valor de Rf similar por lo menos en una de las manchas, tal como se ve en la figura N° 15. También se trabajó con patrones de daizeina y genisteina mostrando algunos componentes de nuestro extracto etanólico comportamiento cromatográfico similar a los patrones al revelarse con el reactivo de Neu y observando bajo luz UV 365 nm, como se muestra en la Figura 16.

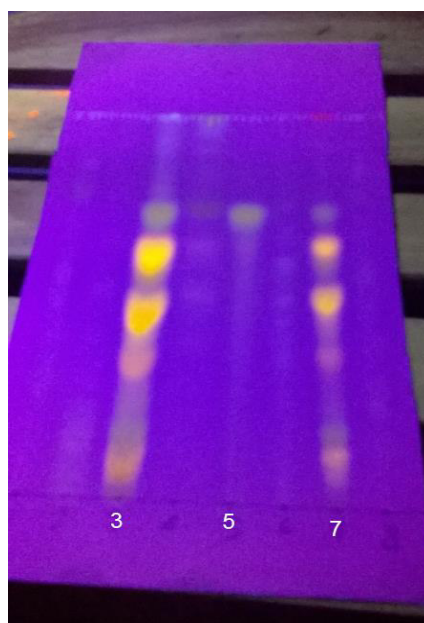


Figura 14. Investigación de vitexina. Revelado con reactivo de Neu, donde (3) y (7) son fracción n-BuOH de extracto alcohólico de *D. molliculum*, (5) es patrón de vitexina. *Fuente:* Elaboración propia.

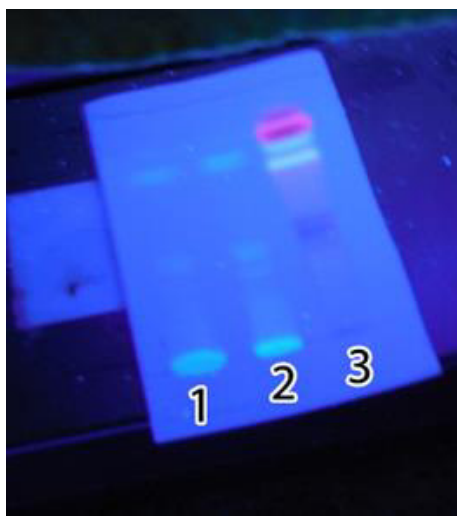


Figura 15. Cromatografía de isoflavonoides revelado con luz UV 366 nm, donde (1) y (2) son fracción n-BuOH del extracto metanólico de harina de soya , (3) es fracción AcOEt del extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*. Fase móvil $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 10:1. *Fuente:* Elaboración propia.

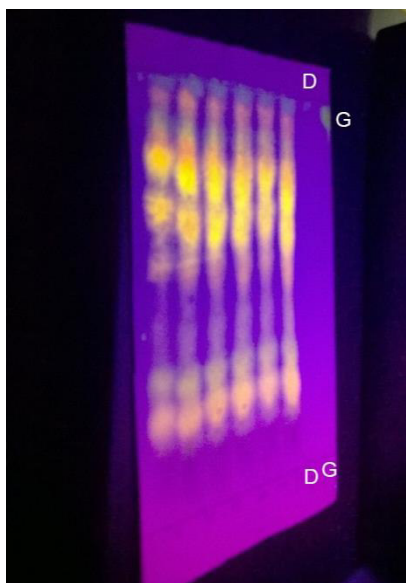


Figura 16. Cromatografía de isoflavonoides revelado con reactivo de Neu, donde (D) patrón de daizeína y (G) patrón de genisteína. Los otros carriles son fracción n-BuOH de extracto alcohólico de *D. molliculum* a diferente concentración. *Fuente:* Elaboración propia.

4.1.2.3 Investigación cromatográfica de saponinas. Se buscó por presencia de saponinas en el extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*, teniendo como referencia el extracto metanólico de harina de semillas de soya. En los cromatogramas mostrados en las Figuras 17 y 18, se puede apreciar manchas que por el color y R_f se muestran similares a las que corresponde a las saponinas de la referencia soya al ser reveladas con reactivo H_2SO_4 /etanol 20% más calor $110^\circ C$, y también Lieberman-Bouchard.

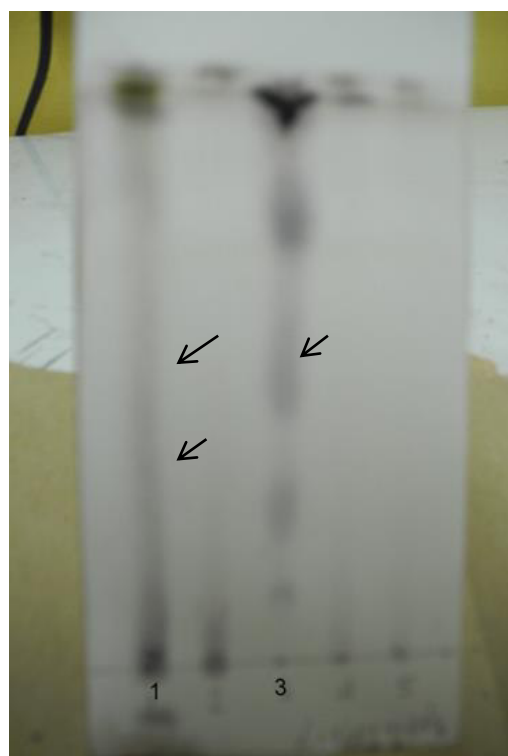
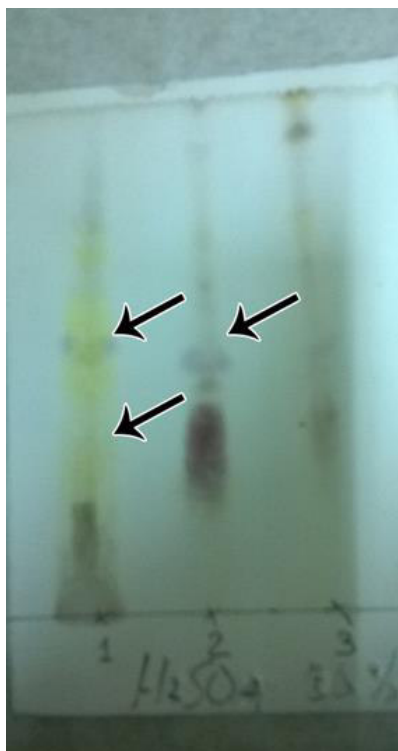


Figura 17. Cromatografía de saponinas. Foto izquierda (1) *D. molliculum* Ext n-BuOH, (2) y (3) Soya Ext n-BuOH, fase móvil n-butanol: etanol: amoníaco 15N (7:2:5). Foto derecha (1) *D. molliculum* fracc. n-BuOH, (3) Soya Ext n-BuOH, fase móvil $CHCl_3$:metanol:agua (65:25:4, 5 corridas) *Fuente:* Elaboración propia.



Figura 18. Cromatografía en capa delgada de fracción eluída con resina Diaion HP 20 carril izquierdo eluato metanol:H₂O (90:10) de fracción n-BuOH del extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*, carril derecho eluato metanol:H₂O (90:10) de fracción n-BuOH del extracto metanólico de harina de soya. Soporte Silicagel G F 254, fase móvil cloroformo : metanol : agua (65:25:4) (5 corridas), revelador Lieberman-Bouchard. *Fuente:* Elaboración propia

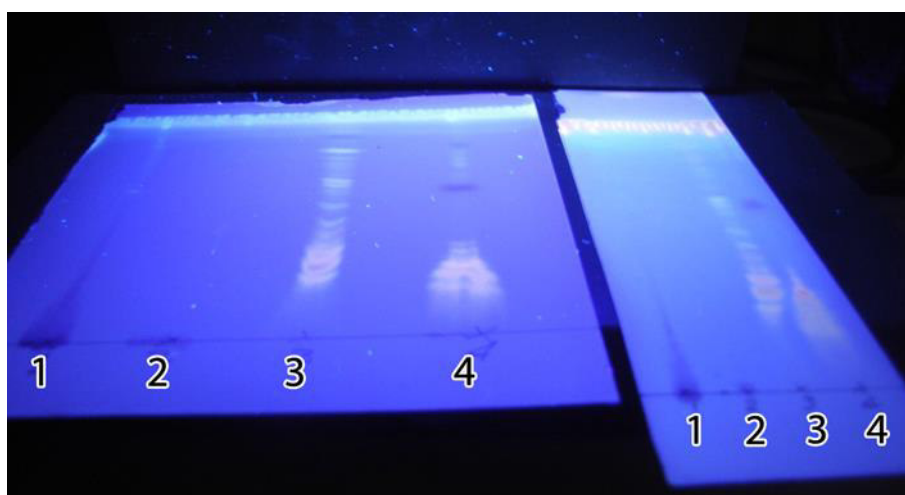


Figura 19. Cromatografía CCD de saponinas Observado bajo luz UV 366 nm luego de reactivo Lieberman-Bouchard y calor donde (1) eluato 90% MeOH de fracción n-BuOH de *D. molliculum*, (2) eluato 100% MeOH de fracción n-BuOH de *D. molliculum*, (3) eluato MeOH 60% de fracción n-BuOH de harina de soya y (4) eluato MeOH 90% de fracción n-BuOH de harina de soya. La fase móvil CHCl₃ : MeOH : H₂O (65:25:4). Se aplicó 5 corridas (secando entre corrida y corrida). *Fuente:* elaboración propia.

4.1.2.4 Control cromatográfico de la separación de flavonoides por extracción en fase sólida. La separación que se hizo por extracción en fase sólida de las fracciones AcOEt y n-BuOH provenientes de la partición del extracto alcohólico seco de hojas de *D. molliculum*, se controló por CCD en silicagel G y se comparó con patrón de extracto de metanólico de harina de soya. Las observaciones se realizaron bajo luz UV 365 nm y con reactivo de Neu. Los resultados mostraron que conforme aumenta la concentración de MeOH en el eluyente, los flavonoides azul y morado a la luz UV de 365 nm y amarillo anaranjado al reactivo de Neu van disminuyendo su intensidad hasta casi desaparecer. En la Figura 20 se muestra como se obtuvo una fracción de isoflavonas casi libre de flavonoides.

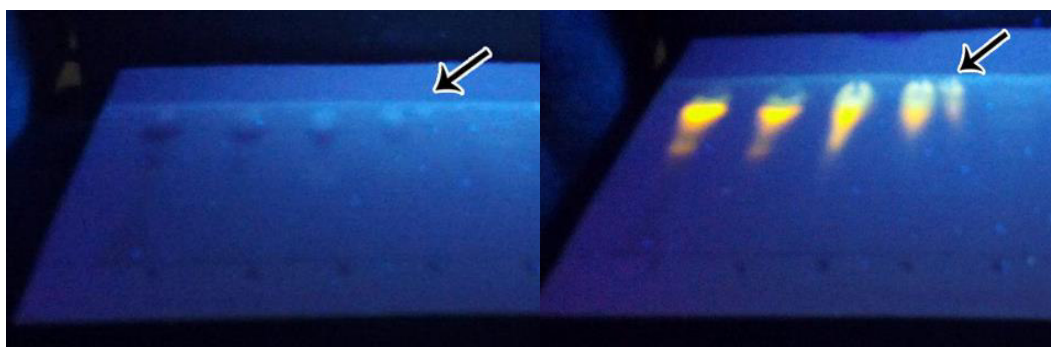


Figura 20. Control cromatográfico del fraccionamiento de flavonoides con resina Diaión HP 20. Foto izquierda, cromatograma de eluatos a gradiente creciente de metanol:H₂O 50:50 a 90:10 , revelado con vapores de amoníaco y bajo luz UV 365, y foto a la derecha revelado con reactivo de Neu y bajo UV 365 nm. Fase móvil BAW (3:1:5). *Fuente:* elaboración propia.

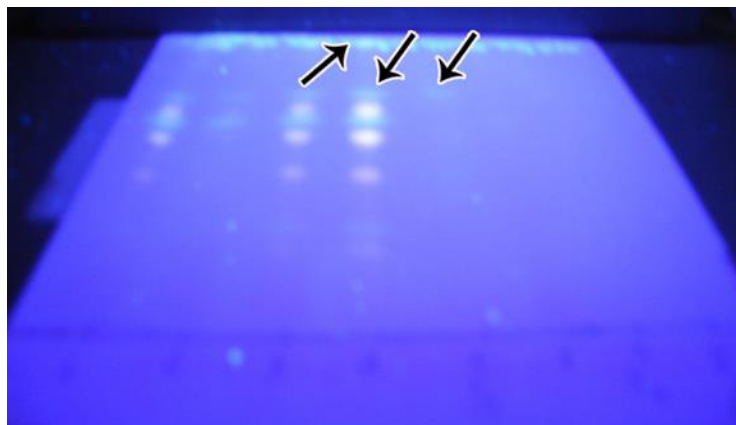


Figura 21. Control cromatográfico de eluatos liberados de flavonoides revelado con reactivo de Neu y luz UV 366 nm, fase móvil AcOEt : ácido fórmico : ácido AcOH : H₂O (100 : 11 : 11 : 26). Las flechas señalan la probable presencia de una isoflavona idéntica al de soja. *Fuente:* Elaboración propia.

- 1 lavado con MeOH 80% de fracc. n-BuOH de *D. molliculum* (1°)
- 2 lavado con MeOH 80% de fracc. n-BuOH de *D. molliculum* (2°)
- 3 lavado con MeOH 90% de fracc. n-BuOH de *D. molliculum* (cabeza)
- 4 lavado con MeOH 90% de fracc. n-BuOH de *D. molliculum* (cuerpo)
- 5 lavado con MeOH 50% de fracc. n-BuOH de harina de soja *G. max*

También se realizó un barrido UV de los eluatos de la extracción en fase sólida con resina Diaion HP 20, tal como se ve en la Figura 22, donde se muestra los espectros de barrido de diferentes eluatos de la extracción en fase sólida de las fracciones n-BuOH y AcOEt. En esta figura se observa cómo va cambiando el perfil de las curvas espectrales conforme el gradiente de MeOH:H₂O se incrementa enriqueciéndose de MeOH y donde la banda I (320-370 nm) correspondiente a flavonoides va desapareciendo gradualmente y se van evidenciando los picos de la banda II (240-260 nm) que corresponderían a isoflavonoides.

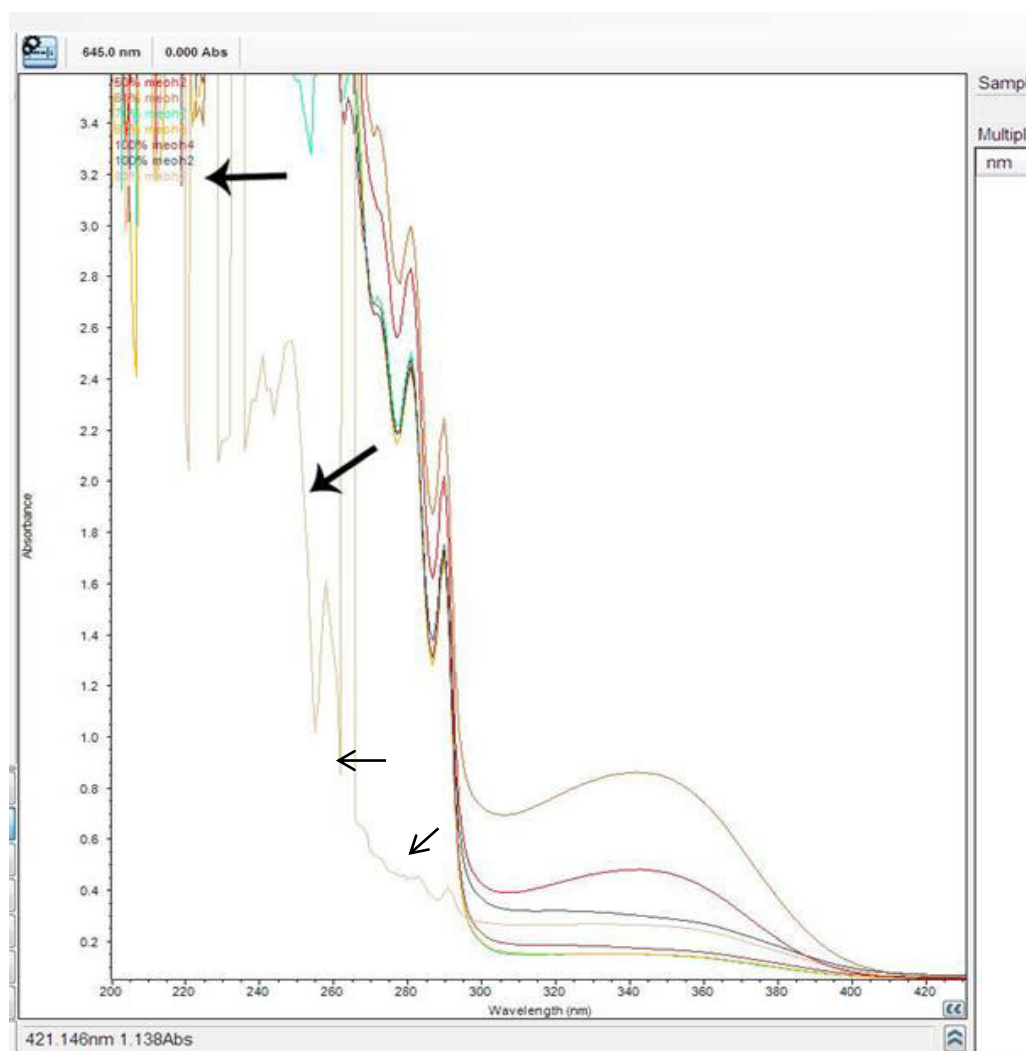


Figura 22. Espectro UV de barrido de diferentes fracciones eluidas. Obtenidas al someter el extracto n-BuOH a la extracción en fase sólida con resina Diaion HP 20. La flecha señala la curva correspondiente al eluato a MeOH:H₂O 90:10. *Fuente:* Elaboración propia.

4.1.2.5 Cromatografía en capa fina preparativa. Para usar en el análisis por UV de barrido. La franja superior (R_f 0,96) podría corresponder a aglicón de isoflavonoide, mientras que la franja intermedia (R_f 0,66) podría tratarse de glucósido o aglicón. Estas dos franjas luego de extraídas se examinaron en el espectrofotómetro UV de barrido.

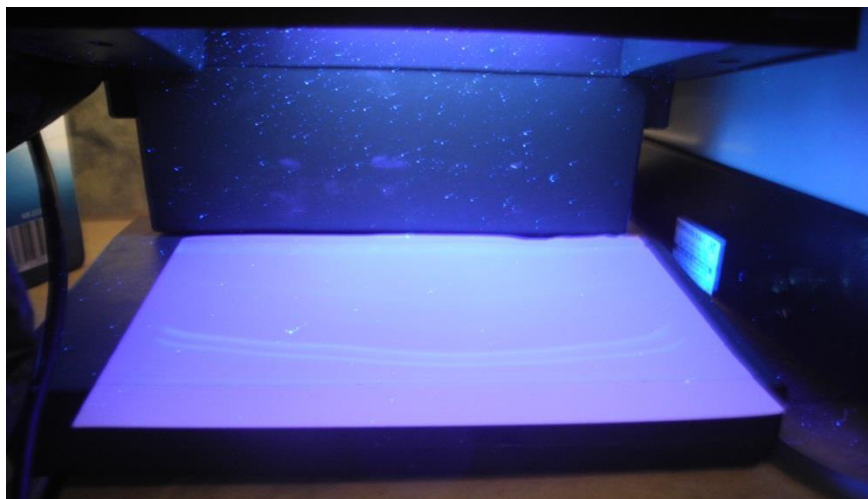


Figura 23. Cromatografía preparativa del eluato MeOH:H₂O 9:1 de la extracción en fase sólida con resina DIAION HP-20 de la fracción n-butanol del extracto alcohólico de *D. molliculum*. (revelado con luz UV 365nm) valores R_f 0,96 0,66 0,40 0,33. Fase Fija: silicagel G, fase móvil AcOEt:ác fórmico:AcOH:H₂O (100 : 11 : 11 : 26). *Fuente:* Elaboración propia.

4.1.3. Estudio por espectroscopía UV

Luego de realizar el análisis por espectroscopía UV de barrido los resultados evidenciaron la presencia de isoflavonas tal como se muestra en las figuras 24, 25, 26 y 27.

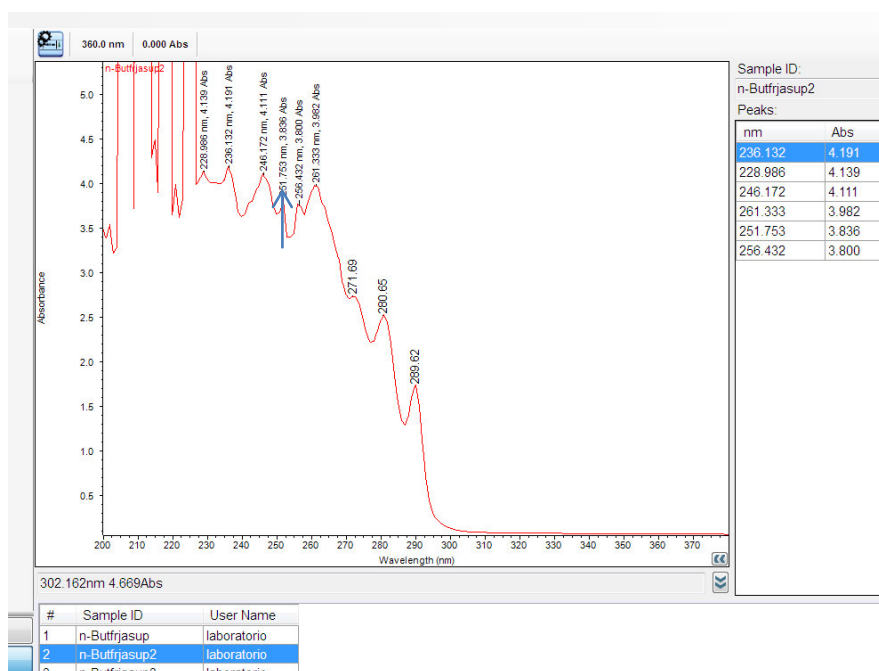


Figura 24. Espectro UV de barrido de la franja n-But-sup2 Rf 0,66 solvente MeOH
Fuente propia

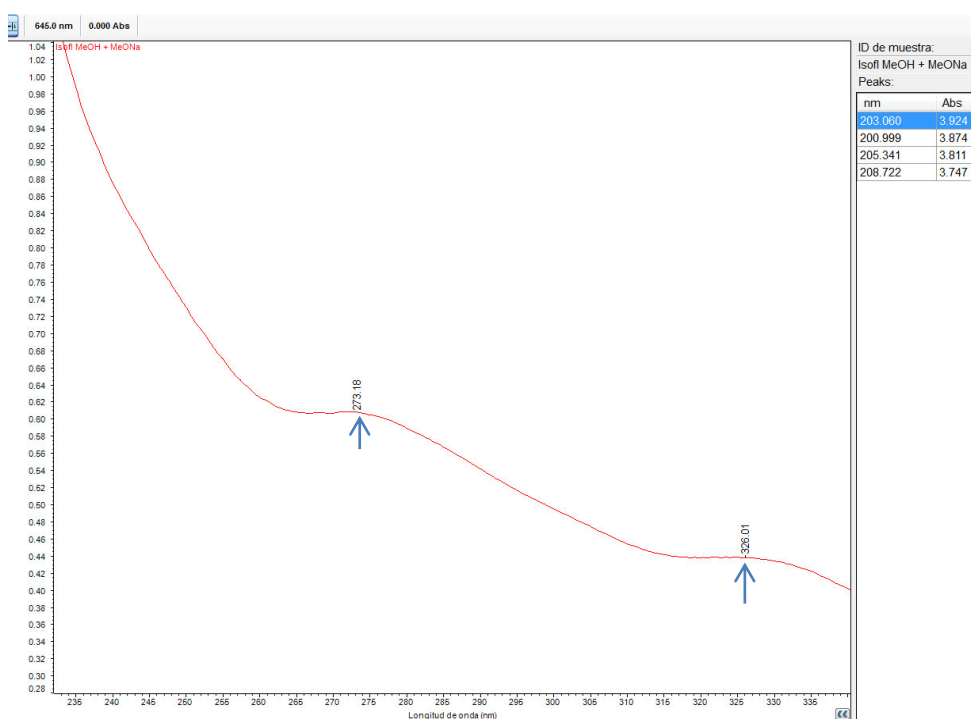


Figura 25. Espectro UV de barrido de la franja n-But-sup2 Rf 0,66 solvente MeOH + MeONa. Fuente propia

Según las tablas de Mabry (1970). la estructura probable es de 4',5,7-trihidroxiisoflavona (genisteína) pico en 261 nm y desplazamiento químico en MeONa a 273 nm y 326 nm. Como se ve en la Tabla 9.

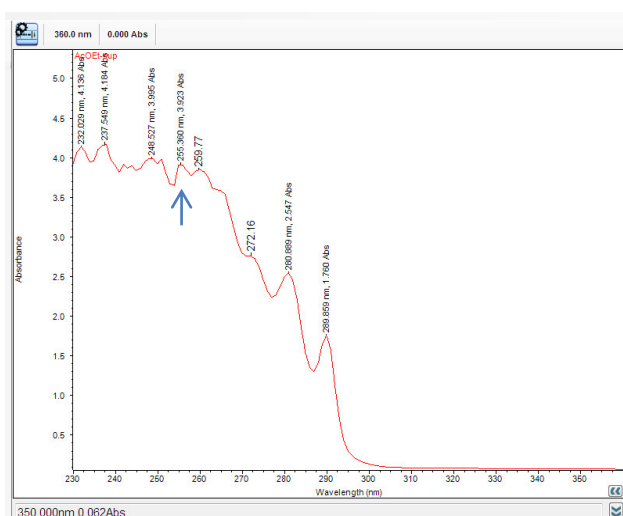


Figura 26. Espectro UV de barrido de la franja AcOEt-sup Rf 0,96 solvente MeOH
Fuente elaboración propia.

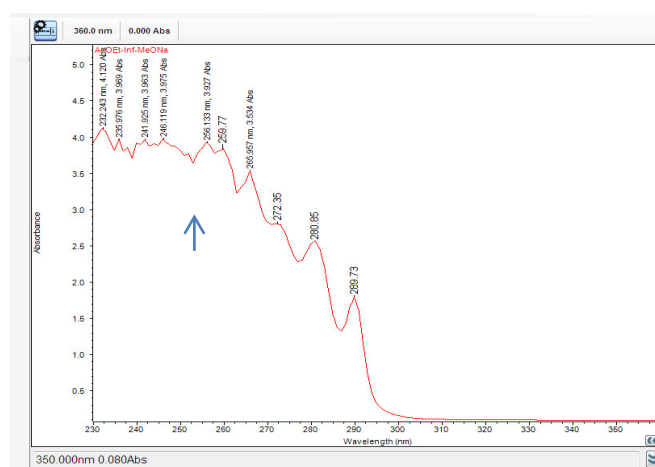
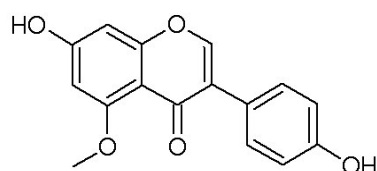


Figura 27. Espectro UV de barrido de la franja AcOEt-sup Rf 0,96 solvente MeOH + MeONa.
Fuente elaboración propia.



Los resultados mostrados en las Figuras 24 y 25 y 26 y 27, nos permiten postular la presencia de la isoflavona Genisteína y la 5-O-metilgenisteína respectivamente, basándonos en los picos según tablas de Mabry, (1970).

256 nm (MeOH) y 266 nm (MeOH + MeONa) = 5-O-metilgenisteína. Vea la Tabla 10.

Tabla 10 **Resultados del análisis por espectroscopía UV de barrido**

<i>Fracciones de la cromatografía preparativa</i>	<i>Desplazamientos experimentales (en nm)</i>	<i>Genisteína (según Mabry T)</i>	<i>5-O-metilgenisteína (según Mabry T)</i>
Fracción isoflavona (Rf = 0,66)	λ^{MeOH} 259 , 328	λ^{MeOH} 261 , 328	
	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$	sh	
	274 , 326	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$	
	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ 272 , 305 ,	276 , 327 sh	
	370	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ 272 , 307 sh	
Fracción isoflavona (Rf = 0,96)	λ^{MeOH} 255		λ^{MeOH} 256
	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$		$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$
	265,95		266

λ^{MeOH} longitud de onda en metanol puro

$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$ longitud de onda en metanol con metóxido de sodio

$\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ longitud de onda en metanol con AlCl_3

Fuente. Elaboración propia.

4.1.4. Resultados de prueba de efecto hipocolesterolémico del extracto alcohólico de *D. molliculum* Manayupa

4.1.4.1 Periodo elevación de la colesterolemia. En la tabla 11 se muestra los valores expresados como promedio más la desviación estándar para las pruebas de colesterol total y LDLc luego del periodo de elevación de la colesterolemia.

Tabla 11. Valores medios de colesterol total y LDLc luego del periodo de inducción.

Grupos	N	Colesterol total mg/dl	LDLc mg/dl
Control negativo	6	55.76 ± 2.78	8.358 ± 2.073
Control positivo	6	63.63 ± 15.51	14.42 ± 7.79

Fuente. Elaboración Propia.

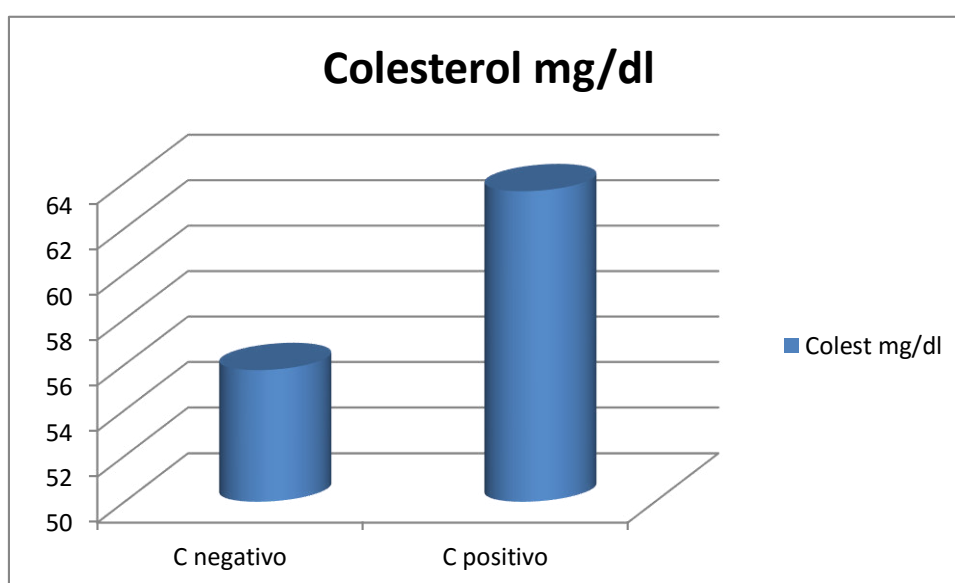


Figura 28 Comparación de niveles medios de colesterol total mg/dl de control negativo y control positivo, al final del periodo de elevación de colesterolemia de 4 semanas. Fuente: Elaboración propia.

De los resultados de la Tabla 10 y de la figura 28 podemos observar que luego del periodo de elevación de colesterolemia de 30 días, se logra un ligero incremento del colesterol total de 14,4 % por encima del grupo dieta normal (control negativo), en el grupo alimentado con dieta normal + colesterol en aceite de oliva (control positivo).

Pero al realizar el análisis por la prueba t-Student se aprecia que estos promedios no se diferencian significativamente $p = 0.275 (> 0.05)$.

Respecto a los niveles de LDLc luego del periodo de elevación de colesterolemia tenemos los resultados que se muestran en la figura 29.

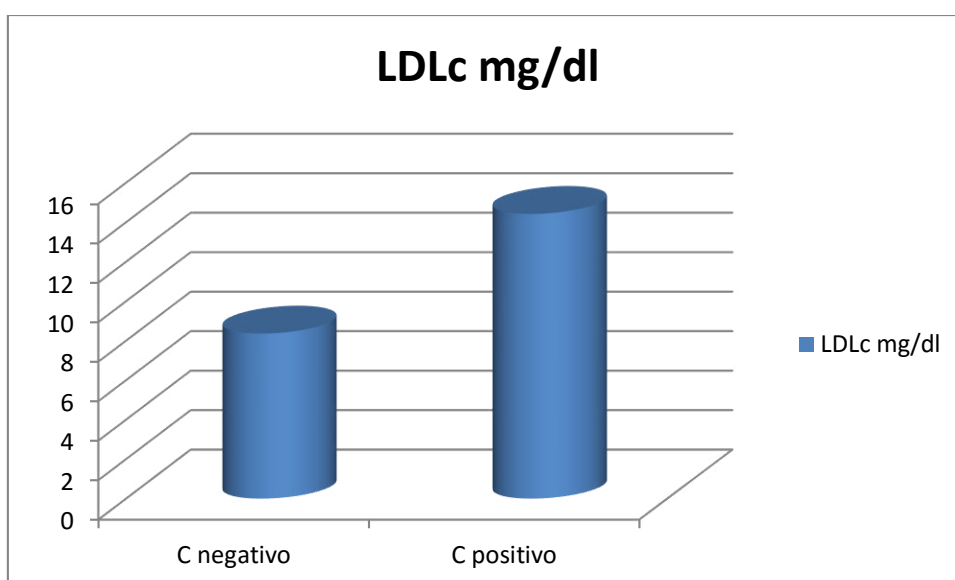


Figura 29 Comparación de niveles medios de LDLc en mg/dl de control negativo y control positivo, al final de la etapa de elevación de colesterolemia.

Fuente: Elaboración propia.

De los resultados de la Tabla 10 y la Figura 29 se establece que al comparar las medias del control positivo respecto del grupo control negativo luego del periodo de elevación de la colesterolemia se obtiene un incremento de la concentración de LDLc de 72,5% en el grupo control positivo por encima del nivel de LDLc del grupo control negativo.

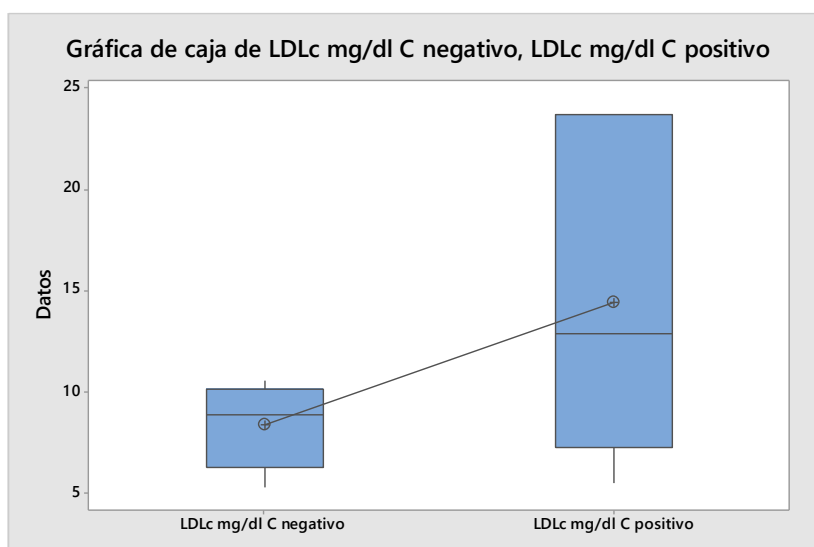


Figura N° 30 Prueba t-Student Comparación LDLc en mg/dl de control negativo y control positivo, al final de la etapa de elevación de la colesterolemia

Fuente: Elaboración propia.

Al realizar el análisis por prueba t-Student se aprecia que luego del periodo de elevación de colesterolemia las medias del grupo control positivo y el grupo control negativo no difieren significativamente $p = 0.125 > 0.05$.

4.1.4.2 Periodo de tratamiento. En la Tabla 12 se muestra los valores expresados como promedio más la desviación estándar para las pruebas de colesterol total y LDLc luego del periodo de tratamiento por 30 días.

Tabla 12. Valores medios de colesterol total HDLc, LDLc y triglicéridos luego del periodo de 30 días de tratamiento.

Grupos	N	Colesterol total mg/dl	LDLc mg/dl	HDLc mg/dl	Triglicerid mg/dl
(1) Control negativo	6	75.59 ± 6.55	18.37 ± 11.61	43.24±10.43	74.86 ±12.14
(2) Control positivo	6	81.17 ± 7.89	18.41 ± 9.79	47.67±7.83	75.43 ±13.49
(3) Desmodium	5	74.13 ± 6.99	12.83 ± 5.55	46.09±8.64	76.07 ±17.90
(4) Atorvastatina	5	74.19 ± 2.95	12.29 ± 11.30	43.93±6.73	89.8 ± 14.72

Fuente. Elaboración propia

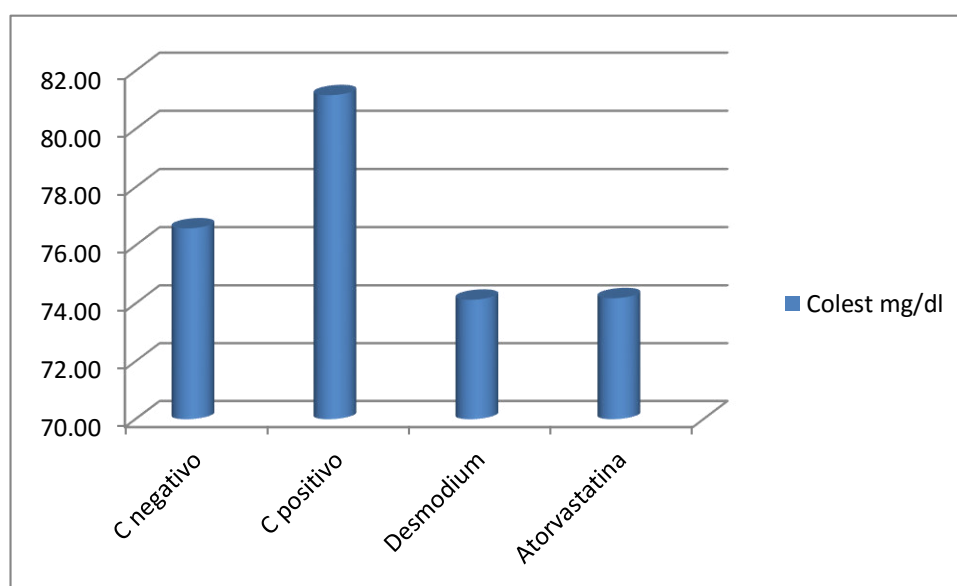


Figura 31 Comparación de los valores medios de colesterol total (mg/dl) al final del periodo de tratamiento cuatro de 4 semanas: (1) control negativo, (2) control positivo, (3) *Desmodium* (4) Atorvastatina.

Fuente: Elaboración propia.

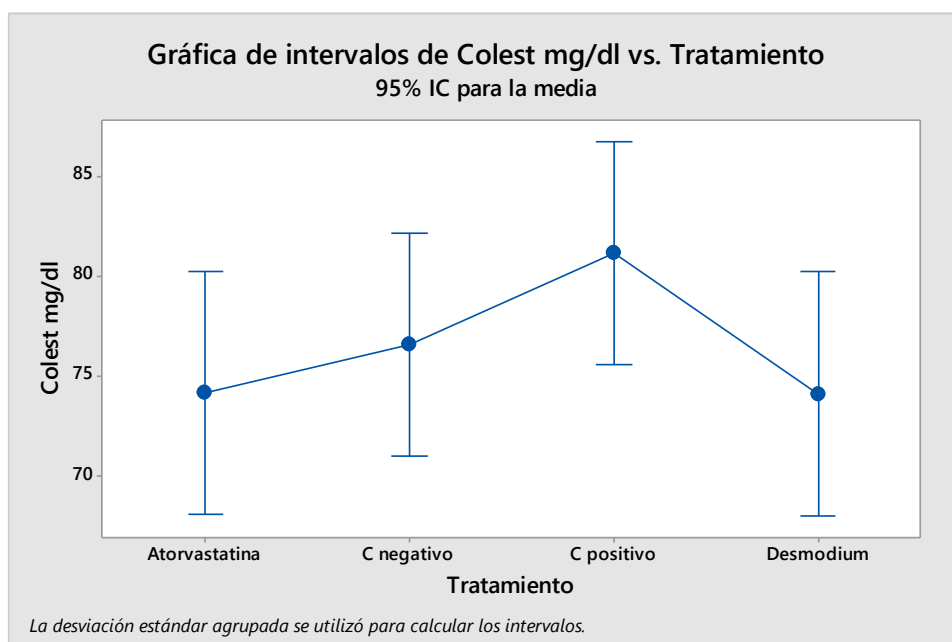


Figura N° 32 Intervalos de confianza para colesterol total al final del periodo de tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

De los resultados de la Tabla 12 y de la Figura 31, podemos observar que luego del periodo de tratamiento de 30 días, con extracto de hojas de *D. molliculum* se logra una ligera disminución de la concentración de colesterol total sérico de 9,1 % debajo del grupo control positivo (dieta normal + colesterol 200 mg/100 mL aceite de oliva).

Al realizar el análisis por prueba t-Student se aprecia que luego del periodo de tratamiento las medias del grupo tratado con extracto de hojas de *D. molliculum* y el grupo control positivo no difieren significativamente $p = 0.156 > 0.05$.

Respecto al parámetro LDLc los resultados de la Tabla 12 y de la Figura 33 nos muestran una disminución de 30.3% de LDLc sérico en el grupo tratamiento con extracto de *D. molliculum* respecto al grupo control positivo.

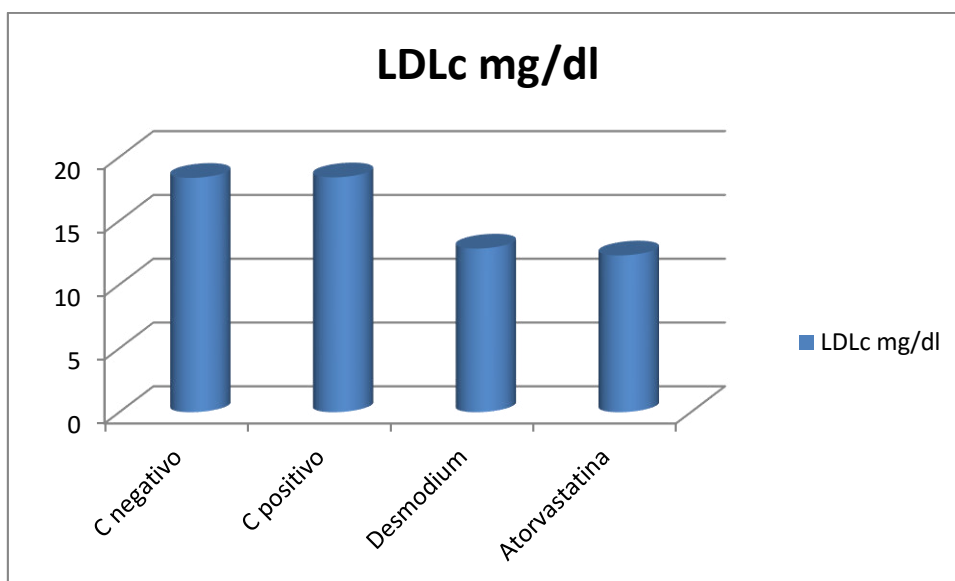


Figura 33 Comparación de niveles medios de LDLc en mg/dl al final del tratamiento (semana 5° a 8°). Elaboración propia.

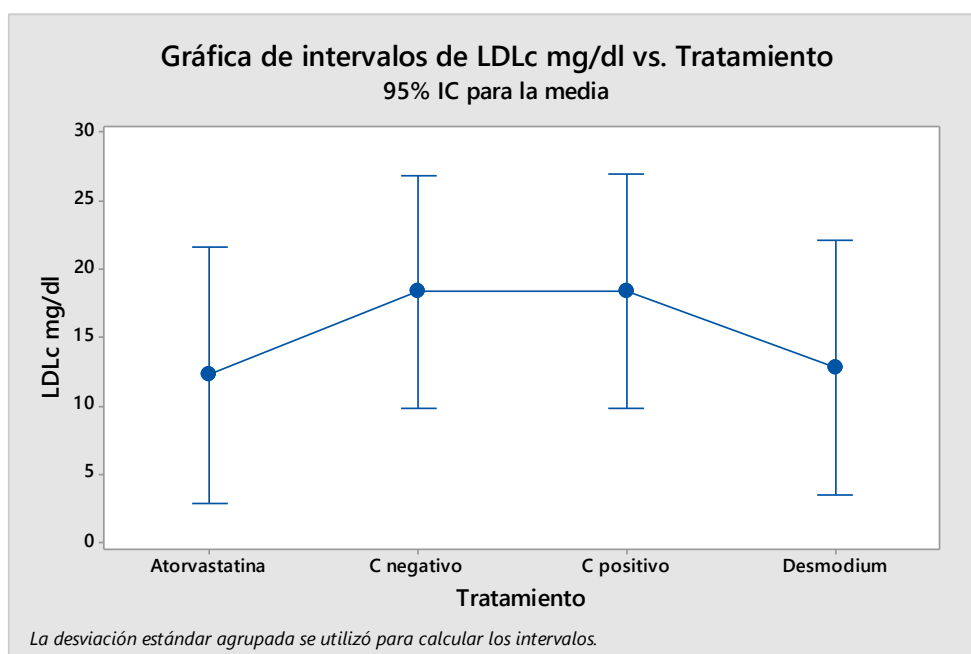


Figura 34 Intervalos de confianza para LDLc al final del periodo de tratamiento. Elaboración propia.

Al realizar el análisis anova se aprecia que luego del periodo de tratamiento las medias del grupo tratado con extracto de hojas de *D. molliculum* y el grupo control positivo no difieren significativamente $p = 0.289 > 0.05$.

4.2. Discusión de resultados

4.2.1. Discusión de resultados

Los datos de la bibliografía sugieren que la presencia de metabolitos secundarios tales como los flavonoides Borradaile (2009), Zeka, (2017), Islam (2015) y saponinas Kang, (2010) Bañuls, (2012), en especies vegetales pueden ejercer un efecto hipocolesterolémico en animales de experimentación, por ello en el presente trabajo se experimentó el efecto hipocolesterolémico del extracto etanólico de *D. molliculum*, ya que su uso como “depurativo de la sangre” en la medicina tradicional apunta en esa dirección. Nuestros resultados muestran que al comparar los valores medios de concentración de colesterol total en sangre del grupo tratado con extracto de *D. molliculum*, respecto al grupo control positivo (hipercolesterolémico), se observa una ligera disminución de los valores de colesterol total en sangre de los animales de experimentación, así como también de los valores de concentración de LDLc, siendo ambos resultados deseables en agentes útiles en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Así, se obtuvo para la dosis oral de extracto 500mg/kg de peso corporal una disminución de 9,1 % respecto al nivel de colesterol total sérico del control positivo (hipercolesterolémico), corroborando nuestros resultados de la prueba preliminar que también mostró un efecto hipocolesterolémico débil, estos resultados concuerdan con los obtenidos para ensayos con drogas con presencia de flavonoides (Arroyo, 2007), Salazar (2003), y de triterpenos (Ching Yi, 2005), en los que se obtuvo una reducción del nivel de colesterol entre 21 - 25 % de colesterol total. También se observó un descenso de la concentración de LDLc en sangre de 30.3%. No obstante, estos resultados son un tanto opacados por el hecho de que no se logró un nivel de hipercolesterolemia óptimo y al hacer el análisis estadístico Anova arroja que los valores medios de control negativo y control positivo durante el periodo de elevación de colesterolemia no difieren significativamente así como tampoco los valores medios del control positivo versus el tratamiento (*Desmodium*) y la droga de referencia atorvastatina después del periodo de tratamiento.

Discutiremos nuestros resultados con el fin de encontrar una explicación a este comportamiento.

4.2.1.1 De la marcha fitoquímica.

El estudio se centró en la búsqueda de saponinas, flavonoides y alcaloides en el extracto alcohólico seco de hojas de *D. molliculum*. Los resultados obtenidos, mostrados en Tabla 8, concuerdan con los de otros autores a nivel nacional Lozano, (2001) y Chang (2009) para la especie *D. molliculum*, y en el extranjero (Taylor, 2009); Lin 1993; Ingham 1984) para otras especies del género *Desmodium*, en los que se demuestra la presencia de estos metabolitos secundarios, que son los que suelen tener actividad biológica.

4.2.1.2 Del estudio cromatográfico.

Los cromatogramas mostrados en las Figuras 13, 14 y 17 nos confirman los resultados de la marcha fitoquímica, es decir la presencia de flavonoides y de saponinas.

Respecto a la presencia de flavonoides nos basamos en el comportamiento frente al revelado a luz UV de 365 nm, donde flavonoles, flavonas e isoflavonoides presentan colores fluorescentes con tono azul, púrpura o celeste blanco lo que concuerda con lo reportado por Mabry (1970). Los resultados obtenidos nos señalaron presencia de flavonas, flavonoles y posible presencia de isoflavonoides. Para confirmar nuestros resultados usamos otro revelador eficiente en la demostración de presencia de flavonoides, el reactivo de Neu (2-aminoetil-difenilborinato al 1% en etanol seguido de polietilenglicol 400 al 5% en etanol + luz UV 365 nm). Según Matteini, et al (2011), la aparición de fluorescencia verde-amarillo-naranja luego de la aplicación del reactivo se ha convertido en la “regla de oro” para detectar flavonoides con mínima interferencia de otros compuestos. Los resultados mostrados en los cromatogramas de las Figuras 13 y 14 nos permiten apreciar manchas de color amarillo naranja y una de tono verdoso, lo cual es indicio de presencia de flavonoles, flavonas o isoflavonoides,

además al revelado solo con luz UV 365 nm se observa algunas manchas con una fluorescencia blanco azulada que luego al ser reveladas con el reactivo de Neu, adquieren una tonalidad más azulada lo que a su vez es indicio de presencia de isoflavonas tal como reporta las que al ser comparadas con algunas de las manchas correspondientes a la muestra de extracto alcohólico de soya concuerdan en Rf y comportamiento a este tipo de revelado (blanco azulado). Esta concordancia en Rf y color de mancha como se ve en la Figura 15, con algunas correspondientes al patrón de soya nos hizo pensar que nuestro extracto alcohólico de hojas también poseía alguno de los isoflavonoides característicos de las semillas de soya. Además cabe mencionar que una de las manchas obtenidas coincide plenamente con la de un patrón de vitexina (una flavona), tanto en valor Rf como en color (tono verdoso) frente al reactivo de Neu, Figura 14, lo que nos indicaría la probable presencia de esta flavona en nuestro extracto alcohólico. La flavona vitexina ya ha sido reportada antes en *D. ascendens* Galand,(2004) y Tsai (2011).

Respecto a la presencia de saponinas, la formación de espuma en la marcha fitoquímica fue un primer indicio que luego se corroboró con la prueba de Lieberman-Bouchard en tubo. El análisis cromatográfico que se realizó se enfocó en verificar la presencia de soyasaponinas debido a que hay estudios sobre su posible papel en la disminución del colesterol en sangre de animales de experimentación (Lee Yoon-Book, Lee Sun-Ok). Se usaron cromatoplasacas de silicagel G y se trabajó con la fase n-butanol de la partición del extracto alcohólico (fig 17) y también con el eluato de MeOH 90% de la extracción en fase sólida con resina Diaión HP 20 (fig 18).

Del cromatograma mostrado en la Figura 17 se puede deducir la probable presencia de saponina esteroideal por el tono violeta rojizo en las mancha con Rf 0,50 al revelar con el reactivo ácido sulfúrico al 30% en etanol, tanto para la mancha del extracto alcohólico de *D. molliculum* como para la de referencia de fracción n-butanol de la partición del extracto alcohólico de semillas de soya, las otras manchas en el carril de la soya Rf 0,35 , 0,28 son de tono gris que corresponderían a las soyasaponinas. El carril

correspondiente al *D. molliculum* muestra manchas en la parte inferior pero que no coinciden con el valor Rf de los de la soya y otras que aparentan ser trazas de soyasaponinas.

Con la finalidad de confirmar la presencia de soyasaponinas en el extracto de *D. molliculum* se fraccionó por extracción en fase sólida el extracto n-butanol de la partición del extracto etanólico. La elección de la resina Diaión HP 20 se basó en reportes previos de Taylor et al, (2009) que la usaron para separar soyasaponinas de isoflavonoides en semillas de soya y que señalan que las soyasaponinas se encuentran en los eluatos finales de la extracción en fase sólida. La evaluación del cromatograma de las muestras sometidas a separación por extracción en fase sólida contrastadas con la referencia de soyasaponinas de soya nos permiten confirmar que en el eluato de 100% de metanol solo hay trazas de soyasaponinas y al parecer las saponinas que presenta podrían ser de naturaleza esteroidea, esto se deduce de los valores Rf y del color obtenido al revelar con el reactivo Liebermann-Bouchard. Figura 19.

Los resultados del estudio cromatográfico confirmarían la presencia de isoflavonoides y la presencia de saponinas, pero también la casi ausencia de soyasaponinas en nuestro extracto alcohólico.

En relación a nuestro estudio del efecto hipocolesterolémico en ratas estos resultados señalarían la presencia de los dos tipos de metabolitos asociados al efecto hipocolesterolémico.

4.2.1.3 Del estudio por espectroscopía UV. El estudio estuvo enfocado en demostrar presencia de isoflavonoides en el extracto alcohólico de *D. molliculum*. Se trabajó con la fracción obtenida de la cromatografía en capa fina preparativa del eluato MeOH 90 % al cual se le hizo un control cromatográfico que demostró la ausencia de flavonas y/o flavonoles y la probable presencia de isoflavonoides tanto por comportamiento frente al reactivo de Neu como por comparación con la referencia de isoflavonoides de

soya Figura 21. También se corrió espectros UV de barrido de diferentes eluatos obtenidos de la extracción en fase sólida que mostraron la eficacia del fraccionamiento en flavonas e isoflavonas. Figura 22, lo que se puede deducir de la gradual desaparición de la banda I de absorción UV como de la progresiva desaparición de las manchas coloreadas amarillo anaranjadas del cromatograma al ser revelado con reactivo de Neu como se observa en Figura 20.

Se realizó el espectro de absorción UV de barrido de la fracción con Rf 0,96 y la de Rf 0,66 de la cromatografía en capa fina preparativa. El perfil del espectro UV ubica los picos de absorción dentro de la zona correspondiente a isoflavonas, es decir fuerte absorción en la zona de 245-275 nm (banda II) y débil o casi ausente.

Los valores obtenidos para la fracción con Rf 0,96 (AcOEt sup) nos indicarían la probable presencia de 5-O-metilgenisteína dado que su pico principal es 256 nm en MeOH y 266 nm en MeONa/MeOH observándose el desplazamiento batocrómico esperado en esta condición.

Los valores obtenidos para la fracción con Rf 0,66 : 259, 328 nm, nos indicarían la probable presencia de 4',5,7-trihidroxiiisoflavona (genisteína), la deducción la hicimos basándonos en los datos espectroscópicos para genisteína según Mabry T. quien propone un pico principal en MeOH de 261 nm, un desplazamiento batocrómico a 273 nm y 326 nm en MeONa/MeOH y un desplazamiento batocrómico con AlCl₃ como se ve en la Tabla 10.

Estos resultados estarían confirmando la presencia de una isoflavona en concordancia con lo ya antes visto en el análisis cromatográfico.

De esta forma se confirmó la presencia de isoflavonas en el extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* que usamos para la prueba biológica.

4.2.1.4 De la Prueba biológica (efecto hipocolesterolémico). A pesar de que la rata es una especie un tanto refractaria a la hipercolesterolemia, se

trabajó con ratas albinas Holtzmann por cuestiones de disponibilidad y economía y porque existen trabajos previos que justifican su empleo Yin et al, (2012) ; Marques et al (2016).

Corroboramos que la elevación de la colesterolemia en ratas es tarea difícil Santos-Gallego et al (2013); Cortés et al (2014), desde que solo logramos un nivel de concentración de colesterol sanguíneo de $63,63 \pm 15,51$ mg/dl y un incremento de 14,1 % en el grupo control positivo respecto al grupo control negativo (dieta normal), siendo así la elevación de la concentración de colesterol en sangre concordante con lo obtenido por Ching-Yi Lin, (2005), $69,4 \pm 11,2$ mg/dl, aunque un tanto alejado del obtenido por Arroyo et al (2007), 105 mg/dl.

El análisis de varianza Anova arrojó diferencia no significativa entre la media del grupo control positivo y el grupo control negativo (ver anexo) . Esto puede deberse a que no se usó ni ácido cólico ni tiouracilo como coadyuvantes, y en lugar de esto se optó por usar aceite de oliva como vehículo para el colesterol apelando a que un aporte calórico extra compensaría la ausencia de estas sustancias tal como se sugiere en Matos et al (2005), y en El-Sayed et al. (2015), sin embargo parecería que el aceite de oliva ha ejercido una acción hipocolesterolemica basada en su alto contenido de ácidos grasos mono-insaturados, este comportamiento ya ha sido reportado por El-Gengaihi et al (2004), quienes administrando dosis de aceite de oliva de 0,5 g/rata, dosis similar a las que usamos como vehículo para el colesterol, obtuvieron descensos del colesterol total en sangre de alrededor de 30%, y también por Geelen y Beynen (2000), quienes reportaron descenso del colesterol total en plasma, sumándose a esto los ya conocidos mecanismos compensatorios propios de la especie Navarro et al (2005).

Luego del periodo de elevación de la colesterolemia, también observamos una elevación de la concentración del LDLc en el grupo control respecto al grupo control negativo, que también resulto no significativa ($p = 0,095$)

Respecto al periodo de tratamiento, la dosis del extracto alcohólico seco de hojas de *D. molliculum* que se usó fue de 500 mg/kg de peso corporal, que se estableció tomando como referencia la dosis usada en los ensayos de efecto diurético Aicardi et al. (2012) de 400 mg/kg de extracto etanólico seco, también tomamos como referencia la dosis usada en la evaluación del efecto anticonceptivo Acaro (2010) en que se usó dosis de 250 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg, y optamos por la dosis 500 mg/kg en vista de la baja solubilidad en agua del extracto alcohólico seco y porque en los trabajos anteriormente mencionados no mostró efectos tóxicos en ratas.

Respecto a los resultados después del periodo de tratamiento se observó una disminución de la concentración de colesterol total del orden de 9,1% y de LDLc de 30,3%, con respecto al grupo control positivo. Cabe mencionar también que el resultado con la droga de referencia atorvastatina se obtuvo una disminución de la concentración de colesterol total de 8,6%, pero en todos los casos la prueba Anova mostró diferencias no significativas entre los valores promedio. Es decir se observó la tendencia a la baja del nivel de la concentración de colesterol sanguíneo, tanto por el extracto de *D. molliculum* como por la droga modelo atorvastatina y en una magnitud parecida y en donde la diferencia no significativa podría deberse a la acción hipocolesterolémica del vehículo aceite de oliva que se traslapa a la de la droga modelo y la del extracto de hojas de *D. molliculum*.

La tendencia a bajar los niveles de colesterol por el extracto de hojas de *D. molliculum* (HBK) se debería a la presencia de flavonoides e isoflavonoides que hallamos en el análisis fitoquímico del extracto alcohólico pues ya hemos visto que estos metabolitos se asocian a actividad hipocolesterolémica tal como lo reportan Zeka K, e Islam B, que asocian esta actividad a su capacidad de bloquear competitivamente el sitio de unión del cofactor en la HMGCoA reductasa bloqueando a su vez la síntesis de colesterol, pero también, según Borradaile, (2002), inhiben la actividad de ACAT y elevan la expresión de receptores LDL, lo que redundaría en una disminución del colesterol total tanto como del LDLc después del tratamiento, tal como se muestra en la Tabla 6.

En nuestro trabajo también se demostró presencia esteroides y saponinas en el extracto alcohólico aunque en baja concentración. De estas sustancias también se han reportado efectos hipocolesterolémicos tal como ha sido documentado por Bañuls, (2012), Kang et al (2010) y Ching-Yi, (2005) , siendo su posible mecanismo de acción fundamentalmente a nivel intestinal inhibiendo la absorción del colesterol de la dieta como el de origen biliar. Por tanto, es posible que estos metabolitos también hayan contribuido a bajar la concentración de colesterol total.

4.3. Pruebas de Hipótesis

Uno de los objetivos específicos de nuestra investigación fue elevar la colesterolemia en ratas albinas por aplicación de una dieta hipercalórica y rica en colesterol, así usamos colesterol disuelto en aceite de oliva la dosis de 200 mg/kg de peso, por tanto teníamos que probar la hipótesis de que aplicando una dieta rica en colesterol (con vehículo aceite de oliva) lograríamos elevar la concentración de colesterol total en sangre de un grupo de ratas (control positivo) de una manera significativa respecto de un grupo de ratas con dieta normal (control negativo).

Para probar esta hipótesis se realizó la prueba t-Student para muestras independientes, para comparar las medias de colesterol total del grupo dieta normal (control negativo) con el grupo hipercolesterolémico (control positivo), obteniéndose los siguientes resultados (con programa estadístico Minitab 17):

T de dos muestras para C negativo vs. C positivo

				Error estándar de la media
	N	Media	Desv.Est.	
C negativo	6	55.76	2.78	1.1
C positivo	6	63.6	15.5	6.3

Diferencia = μ (C negativo) - μ (C positivo)

Estimación de la diferencia: -7.88

IC de 95% para la diferencia: (-24.42, 8.66)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. ≠): Valor T = -1.22 Valor p = 0.275

GL = 5

La diferencia - 7.88 se halla dentro del intervalo de confianza por tanto no hay diferencia significativa entre los grupos control negativo y control positivo con $p = 0.275$

Respecto al objetivo general que era establecer si la ingesta de extracto etanólico de hojas de *D. molliculum* (HBK) provocaría una disminución significativa de la concentración de colesterol en sangre de ratas con hipercolesterolemia, teníamos que probar la hipótesis, “la ingesta de extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* a la dosis de 500 mg/kg de peso provocará una disminución significativa de la concentración de colesterol total en sangre de ratas con colesterolemia elevada”.

Para probar esta hipótesis se empleó el análisis de varianza Anova unidireccional de los resultados obtenidos. Antes de realizar el análisis Anova primero se evaluó la normalidad de los datos provenientes de los grupos: control negativo, control positivo, *D. molliculum* y droga control atorvastatina. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis de distribución normal de los datos por prueba de Ryan-Joiner

<i>GRUPO</i>		<i>Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk)</i>		
		<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Sign</i>
<i>Colesterol total</i>	C negativo	0.947	6	> 0,100
	C positivo	0.963	6	> 0.100
	Desmodium	0,976	5	> 0.100
	Atorvastatina	0.937	5	> 0.100

Fuente: Elaboración propia

Dado que el número de datos de cada grupo es menor que 50, utilizamos la prueba de normalidad de Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk), a partir de la cual podemos concluir que existe evidencia para afirmar los datos de cada grupo provienen de poblaciones con distribución normal, respectivamente.

Además para aplicar la prueba de Anova unidireccional primero tenemos que verificar que los grupos poseen varianzas homogéneas, lo que se comprobó con la prueba de Levene:

Método

Hipótesis nula Todas las varianzas son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una varianza es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
 M

Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar

Tratamiento	N	Desv.Est.	IC
Atorvastatina	5	2.94669	(1.15033, 15.0827)
C negativo	6	6.54785	(3.59164, 20.4504)
C positivo	6	7.89050	(3.83201, 27.8344)
Desmodium	5	6.99164	(2.24623, 43.4846)

Nivel de confianza individual = 98.75%

Pruebas

Método	Estadística de prueba	Valor p
Comparaciones múltiples	—	0.183
Levene	1.44	0.264

Donde los valores p obtenidos son mayores a 0,05 por lo que asumimos varianzas iguales (homogéneas).

Finalmente procedimos al análisis de varianza, con los siguientes resultados:

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	184.4	61.46	1.46	0.258
Error	18	755.9	42.00		
Total	21	940.3			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6.48046	19.61%	6.21%	0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Atorvastatina	5	74.19	2.95	(68.10, 80.27)
C negativo	6	76.59	6.55	(71.03, 82.14)
C positivo	6	81.17	7.89	(75.61, 86.73)
Desmodium	5	74.13	6.99	(68.05, 80.22)

Desv.Est. agrupada = 6.48046

Lo que nos lleva a la conclusión de que no hay diferencia significativa entre los niveles de concentración de colesterol sanguíneo entre los grupos ensayados.

Por último se hizo la prueba de Tukey :

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C positivo	6	81.17	A
C negativo	6	76.59	A
Atorvastatina	5	74.19	A
Desmodium	5	74.13	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En este estudio, la prueba de Tukey no es suficiente para establecer subconjuntos diferentes con los grupos bajo estudio, debido a que concluye que todas las medias de colesterol total son similares o iguales.

A la vista de estos resultados, no se pudo confirmar estadísticamente la hipótesis de trabajo de que los datos sugieren que nuestro extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* (HBK), posee una tendencia a bajar la concentración del colesterol en sangre de ratas Holtzman a pesar del suministro constante de una dieta alta en colesterol.

CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de hojas de *D. molliculum* HBK contiene saponinas, flavonoides, isoflavonoides de los cuales se confirmó la presencia de 4',5,7-trihidroxi-isoflavona (genisteína) y de 5-O-metilgenisteína.
2. El esquema de elevación de la colesterolemia no resultó ser muy eficiente ya que no se obtuvo una elevación significativa, lo que podría deberse a efectos del aceite de oliva como vehículo del colesterol.
3. En las condiciones experimentales, el extracto etanólico de hojas de *Desmodium molliculum* HBK no mostró un efecto hipocolesterolémico significativo en ratas albinas Holtzman.

RECOMENDACIONES

1. Trabajar a escala preparativa para obtener fracciones enriquecidas de flavonoides y de isoflavonoides para usarlas en nuevos ensayos farmacológicos.
2. Buscar esquemas alternativos para la elevación de la colesterolemia en ratas albinas Holtzmann, que excluyan al aceite de oliva como componente hipercalórico.
3. Realizar ensayos de estabilidad y de toxicidad de las fracciones flavonoide e isoflavonoide de esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acaro, F. (2013). Efecto anticonceptivo y postcoital del extracto etanólico de las hojas del *Desmodium molliculum* (HBK).DC “Manayupa” en ratas hembras Holtzmann. *Tesis para optar el grado académico de magister en Farmacología con mención en Farmacología Experimental Fac. de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2010* p. 33 -41.
2. Acero, B., Millones, E., Ticona, D. & Torres, L. (2012). Actividad Antiinflamatoria del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum* en el Modelo Murino de Asma. *CIMEL, Volumen 17, (2)*, 62-67.
3. Addy, M., Dzandu, W.K. (1986). Dose-response effects of *Desmodium adscendens* aqueous extract on histamine response, content and anaphylactic reactions in the guinea pig. *Journal of Ethnopharmacology Vol 18 N°1* 13-20 [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90039-5)
4. Aicardi, G., Alvarez, J., De la Peña, O., Delfino, R., D'uniam, M., Francia, C., Gamarra, A., Lujan, W., Manrique R., Alvarado, Ibañez, L. (2012) Efecto Diurético Del Extracto de *Desmodium molliculum* “Manayupa” en Ratas Albinas. Revista *Forjando. Resúmenes de investigaciones Vol 1* Nro 1 resumen N° 54. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana USMP. <https://www.researchgate.net/.../ANALGESIC-ACTION-OF-Maytenus-krukovii-CHUCH...>
5. Aliev G, Burnstock G. (Julio 1998) Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol Histopathol* 13 (3) p.797-817. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690137>
6. Anowi CF, Onyegbule AF, Onyekabu T, Azode C. (2012). Antipyretic and phytochemical evaluation of the ethanol extract of leaves of *Desmodium velutinum*. *Asian J Pharmaceut Life Sci*, 2(2): 135-145.
Disponibile en <http://www.ajpls.com/admin/Issues/PIssue165.pdf>

7. Arroyo, J., Rael E., Rodriguez, M., Chumpitaz, V., Burga, J., De la Cruz, W., Valencia, J. (2007) Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays L*) en ratas hipercolesterolémicas. *Rev. Perú Med Exp Salud Pública* ; 24(2): 157-162.

8. Bañuls Morant, C. (2012) *Esteroles Vegetales en bebidas lácteas: efecto sobre el perfil lipídico y estimación de su biodisponibilidad*. Tesis Doctoral Facultad de Farmacia Universidad de Valencia. España. Recuperado de:
https:
[//www.educacion.gob.es/Teseo/imprimirficheroTesis.do?idFichero=35282](http://www.educacion.gob.es/Teseo/imprimirficheroTesis.do?idFichero=35282)

9. Barrett K., Barman S., Boitano, S., Brooks, H. (2013) *Ganong Fisiología Médica*. 24ª Edición. Editorial Mc Graw-Hill.
ISBN 978-607-15-0874-4 Recuperado de <http://booksmedicos.me/ganong-fisiologia-medica-24a-edicion/chequear>

10. Berhow, M., Cantrell, C., Duval, S., Dobbins, T., Maynes, J., Vaughn, S. (2002). Analysis and Quantitative Determination of Group B Saponins in Processed Soybean Products. *Phytochem. Anal.* 13. 343-348. DOI: 10.1021/jf053072o

11. Borradaile N, Dreu de, L, Wilcox L, Edwards J, Huff M. (2002). Soya phytoestrogens, genistein and daidzein decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochemistry J.* 366, 531-539 Great Britain. Disponible en :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222800/pdf/12030847.pdf>

12. Bhosle, V. (2013), Anticonvulsant and antioxidant activity of aqueous leaves extract of *Desmodium triflorum* in mice against pentylenetetrazole and maximal electroshock induced convulsion.
Brazilian Journal of Pharmacognosy (p. 692) 23(4): 692-698,
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2013000400018

13. Campbell, P., Smith, A., Peters, T. (2007). *Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*. Barcelona. España: Editorial Elsevier. 5°ed. Libro lectura en línea, recuperado de: <http://bookspoes.club/es/php?id=8445816047&src=fbs>

14. Cardellá L., Hernandez, R. (2013). Metabolismo Intermediario y su Regulación. *Bioquímica Médica 2 Tomo III*. La Habana. Cuba. Ciencias Médicas. Recuperado de <https://clea.edu.mx/biblioteca/Bioquimica%20medica%20Tomo%20III.pdf>

15. Castañeda Valencia, G., Condori Peñaloza E. (2010). *Catálogo y Estudio Farmacognóstico de plantas medicinales del distrito de Llacanora, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca*. (Tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico) Fac. Farmacia y Bioquímica EAP Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima, Perú. Recuperada de: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1620>

16. Chan, J., Karere, G., Cox, L. & VandeBerg, J. (2015). Hypercholesterolemia. *book edited by Sekar Ashok Kumar, ISBN 978-953-51-2169-5 capítulo 1*. Recuperado de open book <http://dx.doi.org/10.5772/59610>

17. Chang, A., Klinar, S., Castillo, P., Peralta, K. (2009). Screening Fitoquímico de *Gentianella alborosea*, *Desmodium* sp. y *Tiquilia paronychioides*. *FITOICA Revista Científica*. Año 4. N°1. P.7-11. <http://www.bibliotecafarmaceutica.com/Fitoica/2009/Num%201/Art1.pdf>

18. Ching-Yi Li et al. (2005). Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets. *World Journal of Gastroenterology* 2005 11(35): 5549-5552 DOI: 10.3748/wjg.v11.i35.5549

19. Cortés, M., Leal, P., Chávez, B., Cárdenas, M., Meraz, M. (2014). Effect of Cholesterol Enriched or Fatty-Acid diets on Cholesterol and Lipid Levels in Young Wistar Rats. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 846-852. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.510099>
Disponible en https://file.scirp.org/pdf/ABB_2014092915080904.pdf

20. Deshpande, H. y Bhalsing, S. (Febrero 2014). A Review of Phytochemical Profile of *Desmodium gangeticum* (L.) *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care Issue 4, Vol 1* pag. 36-48. Recuperado de <http://rspublication.com/ijphc/2014/feb14/4.pdf>

21. Dhande, S., Gursahani, M., Kadam, V. (2014) Standardization of Cholesterol Suspensión Induced Hyperlipidemia in Rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 3 N° 12* pag 1107-1123. Recuperado de www.wjpps.com/download/article/1417507638.pdf

22. Dornas, W., Oliveira de, T., Augusto, L., Nagem, T. (2010). Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arq Bras Cardiol; 95(2): 272-278*. Recuperado de http://www.scielo.br/pdf/abc/v95n2/en_a20v95n2.pdf

23. Doucet, Ch., Flament, C., Sautier, C., Lemonnier, D., Mathon, G. y N'Diaye, A. (1987) Effect of an hypercholesterolemic diet on the level of several serum lipids and apolipoproteins in nine rat strains. *Reproduction Nutrition D'evloppement, 27 (5)*, pp.897-906. Recuperado de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00898701/document>

24. El-Gengaihi S, Salem A, Bashandi S, Ibrahim S, Abd el-Hamid. (2004) Hypolipidemic effect of some vegetable oils in rats. *Food, Agriculture & Environment Vol 2 (2) : 88-93*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/267689183_Hypolipidemic_effect_of_some_vegetable_oils_in_rats

25. El-Sayed H, Abd Elrahman M, Emara A, Abd El-Hafez A.(2015) Compare effect of fatty acid composition (olive, coconut and butter) on adipose liver tissue, and serum lipid profile in albino rats. *IOSR-Journal of Biotechnology and Biochemistry. vol 1 N° 3* . Recuperado de <http://www.iosrjournals.org/iosr-jbb/papers/Vol1-issue3/F0132838.pdf>

26. Galand N, Ragot J, Dollet J. et al. (2004) Comparison of saponins and flavonoids in various African species of *Desmodium adscendens* from different countries: Analysis and OPLC Purification. Poster. Recuperado de

<http://disruptechno2.free.fr/OPLC/Scientific%20posters/Poster%20Saponins%20and%20Flavonoids.pdf>

27. Ganjhu R.K, Mudgal P.P., Arunkumar G. (2014). Pharmacological and Phytoconstituent profile of *Desmodium gangeticum*-An Update. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*; 6(3): 643-657. Recuperado de <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/6/IJPPR,Vol6,Issue3,Article38.pdf>

28. Geelen M, Beynen A.(1999). Consumption of olive oil has opposite effects on plasma total cholesterol and sphingomyelin concentrations in rats. *British Journal of Nutrition*, 83 pag 541-547 Recuperado de <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/898EE40413C30080BFCF504ED1E04438/S0007114500000684a.pdf/div-class-title-consumption-of-olive-oil-has-opposite-effects-on-plasma-total-cholesterol-and-sphingomyelin-concentrations-in-rats-div.pdf>

29. Golomb, B. & Evans, M. (2008). Statin Adverse Effects: A Review of the Literature and Evidence for a Mitochondrial Mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs*, 8(6), p.373–418. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Beatrice_Golomb/publication/238077077/Statin_Adverse_Effects_A_Review_of_the_Literature_and_Evidence_for_a_Mitochondrial_Mechanism/links/0f31753adc205031ae000000/Statin-Adverse-Effects-A-Review-of-the-Literature-and-Evidence-for-a-Mitochondrial-Mechanism.pdf doi: 10.2165/0129784-200808060-00004

30. Hammond, G., Fernandez, I., Villegas, L., Vaisberg, A. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. (61), p. 17–30. Recuperado de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.504.9218&rep=rep1&type=pdf>

31. Harikumar K., Abdul Althaf, S., Kishore Kumar, B., Ramunaik, M. & Suvarna, CH. (2013). A review on Hyperlipidemic. *International Journal of*

- Novel Trends in Pharmaceutical Sciences. Vol.3 N°4.p.59-71. Recuperado en*
http://www.ijntps.org/File_Folder/0043.pdf
32. Hu, J., Reddy, M., Hendrich, S., Murphy, P. (2004). Soyasaponin I and soyasapogenol B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavailability in women. *The Journal of Nutrition Vol. 134 N°8* 1867-1873. recuperado en
<http://jn.nutrition.org/content/134/8/1867.full.pdf+html>
33. Huang, Z., Zhang, Q., Kang, W., Li Ch., Chen, Q. (2010), Study on Chemical Constituents of *Desmodium heterocarpon*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae* 2010-17
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSFX201017030.htm
34. Ingham, J., Dewick, P. (1984). The Structure of Desmocarpin, a Pterocarpan Phytoalexin from *Desmodium gangeticum*. *Z. Naturforsch. 39c*, p.531-534.
http://zfn.mpdl.mpg.de/data/Reihe_C/39/ZNC-1984-39c-0531.pdf
35. Islam, B., Sharma, C., Adem, A., Aburawi, E., Ojha, S. (2015). Insight into the mechanism of polyphenols on the activity of HMGR by molecular docking. *Drug Design, Development and Therapy. 9*. Pp. 4943-4951. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4560516/pdf/dddt-9-943.pdf>
36. Jawi n, J., Nastalek, P., Korb t, R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55, 3, pp. 503-517
https://www.researchgate.net/publication/8332803_Mouse_models_of_experimental_atherosclerosis
37. Kang, J., Badger, T., Ronis, M. & Wu, X. (2010). Non-isoflavone Phytochemicals in Soy and Their Health Effects. *J. Agric. Food Chem.*, 58, (14), p. 8119-8133. Recuperado en
https://www.researchgate.net/publication/44800704_Non-isoflavone_Phytochemicals_in_Soy_and_Their_Health_Effects

38. Kannel, W., Dawber, T., Friedman, G., Glennon, W. & McNamara, P. (1964). Risk Factors in Coronary Heart Disease an Evaluation of Several Serum Lipids as Predictors of Coronary Heart Disease The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*. (61), (No. 5) p. 888-99. Recuperado en <http://wp.vcu.edu/drim2013block4/files/2013/11/Framingham-lipids.pdf>

39. Klejdus, B., Trinácty, J., Hrdlicka, P., & Kuban, V. (2001). Comparison of Solid-Phase Extraction Procedures for Isolation of Plant Isoflavones Prior to Liquid Chromatographic Determination. *Chem. Pap.* 55(5)285—289. http://www.chempap.org/file_access.php?file=555a285.pdf

40. Kubo T. , Hamada S. , Nohara T. , Wang ZR, Hirayama H. , Ikegami K. , Yasukawa K. , Takido M. Study on the constituents of *Desmodium styracifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1989 [37(8) : 2229-2231] https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/37/8/37_8_2229/_pdf

41. Kumar, A., Salam, D., Surya, A., Tomy, D., Carla, B., Sunil, C. (2013). A review of hiperlipidemia and medicinal plants. *Int.J.A.PS.BMS vol.2* (4) pp 219-237. ISSN-2277-9280 Disponible en https://www.researchgate.net/publication/262817622_A_REVIEW_OF_HYPERLIPIDEMIA_AND_MEDICINAL_PLANTS

42. Lakhne R., Gupta R. (2015). Active Fitoconstituents for Controlling Hypercholesterolemia: A Review. *Int. J. Clin. Endocrinol Metab* 1(1): 022-030 2015 disponible en <https://www.peertechz.com/Clinical-Endocrinology-Metabolism/pdf/IJCEM-1-106.pdf>

43. Lee, Y.B., Lee H.J., Kim, Ch.H., Lee, S.B., Sohn, H.S. (2005). Soy Isoflavones and Soyasaponins: Characteristics and Physiological Functions. Review. *Agric. Chem. Biotechnol.* 48(2) 49-57. Recuperado en <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.844.3936&rep=rep1&type=pdf>

44. León, A., Blanco D., Peña, A., Ronda, M., González, B., Arteaga, M.,Mancebo, A. (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB)
45. Nelson, D.,Cox, M. (2014). *Lehninger Principios de Bioquímica*, ed. 6° Editorial Omega.
46. Lin, Ch. Y., Tsai, Ch. Y., Lin, S.H. (2005). Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets. *World Journal of Gastroenterology* 11(35): 5549-5552
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320370/>
47. Lin,Y., Kong,L. Enero (1993) Studies on the Chemical Constituents of *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. Recuperado de:
https://www.researchgate.net/publication/228771368_Studies_on_the_Chemical_Constituents_of_Desmodium_styracifolium_Osbeck_Merr
48. Lock de Ugaz, Olga. (1994) *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Lima, Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
49. Loja Herrera, B. (2002). *Contribución al estudio florístico de la Provincia de Concepción, (Junín): Dicotiledóneas*. (Tesis para optar el grado de Magister en Botánica Tropical) Fac. Ciencias Biológicas Unidad de Postgrado UNMSM. Lima, Perú. Recuperado en <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1579>
50. Lozano, N., Bonilla, P., Arroyo, J., Arias, G., Córdova, A. y Baldoceda, F. (2001). Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. (Manayupa). *Revista Ciencia e Investigación* Vol.IV(2),p. 37 – 44.
51. Manting, L., Haihong, Z., Jing, L., Shaodong,C., Yihua, L.,(2011) The model of rat lipid metabolism disorder induced by chronic stress accompanying high-fat-diet. *Lipids in Health and Disease*, 10:153.

doi: 10.1186/1476-511X-10-153

<http://www.lipidworld.com/content/10/1/153>

52. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Calhau C. (2016) High-fat diet-induced obesity rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rat. *Adipocyte Vol 5*, N° 1 11-21 doi: 10.1080/21623945.2015.10617000023

53. Matos, S., Paula, H., Pedrosa, M., Cardoso, R., Oliveira, E., Chianca, J. & Silva, M. (Marzo 2005) Dietary Models for Inducing Hypercholesterolemia in Rats. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Vol.48*, n. 2: pp. 203-209. Recuperado en <http://www.scielo.br/pdf/babt/v48n2/23759.pdf>

54. Muanda, F., Bouayed, J., Djilani, A., Yao, Ch., Soulimani, R. y Dicko, A. (2011) Chemical Composition and, Cellular Evaluation of the Antioxidant Activity of *Desmodium adscendens* Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. ID artículo 620862. doi:10.1155/2011/620862

55. Mutyala N., Aniel, K. (2016). Antimicrobial activity and Phytochemicals constituents of *Desmodium gangeticum* leaves. *International Research Journal of Agricultural and Food Sciences Vol.1N°3*. Recuperado en <http://www.prudentjournals.org/IRJAFS>

56. Navarro, M., Arbonés, J., Acín, S., Carnicer, R., Sarriá, A., Surra, J., y Osada J. (2005) Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl. 17(2):82-93*. Recuperado en file:///C:/Users/Usuario/Downloads/13074009_S300_es.pdf

57. Oleszek, W., (2002) Review. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, 967 p. 147–162. https://www.researchgate.net/profile/Wieslaw_Oleszek/publication/11169375_Chromatographic_determination_of_plant_saponins/links/0c960529c4b2846fa9000000.pdf

58. Organización Mundial de la Salud, (2014). Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. Recuperado en apps.who.int/iris/bitstream/10665/149296/1/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf

59. Patil V, Somkuwar S y Deokule S. (2016) High frequency of multiple shoot induction and genistein and daidzein in *Desmodium gangeticum* (L.) Dc. by using different concentrations of BAP. *Int J of life Sciences*, special issue A6 February 2016 pag 101-104. Recuperado en <http://oaji.net/articles/2016/736-1463308490.pdf>)

60. Pérez F, León G, Rodríguez F, Vásquez L. (2011) Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. *Pueblo Continente* 22 (2). Recuperado en [http://www.upao.edu.pe/publicaciones/PUEBLO_CONTINENTE/PUEBLO_CONTINENTE_22\(2\)_2011.pdf](http://www.upao.edu.pe/publicaciones/PUEBLO_CONTINENTE/PUEBLO_CONTINENTE_22(2)_2011.pdf)

61. Phan, B., Dayspring,T., Toth P. (2012). Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc Health Risk Manag.* ; 8: 415-427. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3402055/>

62. Popescu, ML, Arama, C., Dinu, M., Costea, T. (2009) Contributions to the Pharmacognostical and Phytobiological Study on *Sojae Semen*. *Farmacia*. Vol. 57, 5 p. 562-569. <http://www.revistafarmacia.ro/20095/issue52009art05.pdf>

63. Poveda, E., Ayala, P., Rodríguez, M., Ordóñez, E., Baracaldo, C., Delgado, W., Guerra, M. (2005) Efecto del suplemento de aceites vegetales sobre el perfil lipídico en ratas Wistar. *Biomédica* 25: 101-109. Recuperado en : <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v25n1/v25n1a11.pdf>

64. Rahman K., Barua, S., Islam, F., Sayeed, M., Parvin, S., Islam, E. (2013). Studies on the anti-diarrheal properties of leaf extract of *Desmodium puchellum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 3(8): 639-643 doi: 10.1016/S2221-1691(13)60129-X.

65. Robles, J., Hernández, R. y Fonte, R. (1999) Diagnóstico y Tratamiento de las Hiperlipoproteinemias. *Rev Cubana Med Gen Integr* 15(4):461-72. Recuperado en: http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol15_4_99/mgi20499.pdf
66. Salazar Diaz, J. (2003) *Contribución al Estudio Químico y Farmacológico de la Gentianella Umbellata (G. Don) Fabris*. (Tesis para optar grado magister PUCP).
67. Santana, J., (2009) *Efecto de Durvillaea antártica sobre el colesterol total sanguíneo en ratas hembra Sprague-Dawley alimentadas ad libitum con concentrado estandarizado para ratas*. Memoria de título presentado para optar el título de médico veterinario Univ. Austral de Chile 2009. Disponible en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fvs196e/doc/fvs196e.pdf>.
68. Santos-Gallego, C., Badimon, J. e Ibáñez, B. (2013). Modelos experimentales de aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol Supl.* 13(E):3-12. DOI: 10.1016/S1131-3587(13)70087-6
69. Segura, L., Agustí, R., Ruiz, E., Valencia A., Rivera C., Concha W... & Torpoco E. (2013). Factores de Riesgo de las Enfermedades Cardiovasculares en el Perú II. Estudio TORNASOL II comparado con TORNASOL I después de cinco años. *Revista Peruana de Cardiología*. Vol. 39 N°1 p.5-59. Recuperado de: <http://www.revespcardiol.org/es/modelos-experimentales-aterosclerosis/articulo/90255371/>
70. Soto M., Conde E., Gonzalez-Lopez, N., Conde, M., Moure, A., Sineiro, J., ..& Parajó, J. (2012). Recovery and Concentration of Antioxidants from Winery Wastes. *Molecules*, 17, 3008-3024. Recuperado en <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/molecules-17-03008.pdf>
71. Steven P. y Ude C. (2016) Hypolipidaemic effect of aqueous extract of *Desmodium velutinum* leaf on albinum wistar rats. *Advancement in Medicinal Plant Research* Vol 5(4) pp 47-50. Recuperado en https://www.researchgate.net/publication/321837478_Hypolipidaemic_effect_of_aqueous_extract_of_Desmodium_velutinum_leaf_on_albino_wistar_rats DOI: 10.30918/AMPR.54.17.024

72. Taylor, W., Sutherland, D. & Richards, K. (2009) Soyasaponins and Related Glycosides of *Desmodium canadense* and *Desmodium illinoense*. *The Open Natural Products Journal*, 2, p.59-67.

73. Temel RE, Rudel LL. (Noviembre 2007). Diet effects on atherosclerosis in mice. *Curr Drug Targets* 8 (11) p.1150-1160. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045093>

74. Tojcic, Jelena. (2009) *Étude Pharmacogénétique d'un hypolipémiant* (Memoria para la obtención de grado de maestro en ciencias (M. Sc.) Facultad de Farmacia Universidad de Laval, Québec, Canada). Recuperado de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.428.1823&rep=rep1&type=pdf>

75. Tsai, JC, Huang, GJ, Chiu TH, Huang, SS, Huang, SC, Huang,...Lee,CY(2011). Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(4), 468-476. Recuperado en <http://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/641D31928098>
DOI: 10.5897/AJPP11.059

76. Wang J, Chu BB, Ge L., Li, BL, Yan, Y., Song BL.(2009) Membrane topology of human NPC1L1, a key protein in enterohepatic cholesterol absorption. *J Lipid Res* 50; 1653-62. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325169>

77. Wolf, W. y Thomas, B. (2002). Analysis and Quantitative Determination of Group B Saponins in Processed Soybean Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 47, Xo. 3, pp: 86-90. Recuperado en <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=31263&content=PDF>

78. Yin, W., Carballo-Jane, E., Mc.Laren, D., Mendoza, V., Gagen, K., Geoghagen, N., ...y Gorski, J. (2012) Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *J. Lipid Research*. 53: 51-65. Recuperado en: <http://www.jlr.org/content/53/1/51.full.pdf>
79. Zhang, L., Zhang, Q., Kang W., Liu Ch., Lu Y. (2012). Chemical constituents of *Desmodium sequax* Wall. *Chinese Traditional Patent Medicine* ,10. Recuperado en: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZCYA201210026.htm
80. Zeka,, K., Ruparelia, K., Arroo, R., Budriesi, R., Micucci, M. (2017). Flavonoids and their metabolites: Prevention in cardiovascular diseases and diabetes. *Diseases*, 5, 19. DOI: 10.3390/diseases5030019
<https://www.mdpi.com/2079-9721/5/3/19>

ANEXOS

I. CERTIFICADO DE ESPECIE *Desmodium molliculum* HBK

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N°094-USM-2011

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (completa), recibida de **DANILO BARRETO YAYA**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM; ha sido estudiada y clasificada como: *Desmodium molliculum* (H.B.K.) DC., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Desmodium*

ESPECIE: *Desmodium molliculum* (H.B.K.) DC.,

Nombre vulgar: "Manayupa"
 Determinada por: Mg. María I. La Torre A.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 25 de mayo de 2011



Haydeé Montoya Terreros
Dra. Haydeé Montoya Terreros
 JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS
 (USM)

DDB

II. RESULTADOS DE PERFIL LIPÍDICO DESPUÉS DEL PERIODO DE INDUCCION DE HIPERCOLESTEROLEMIA

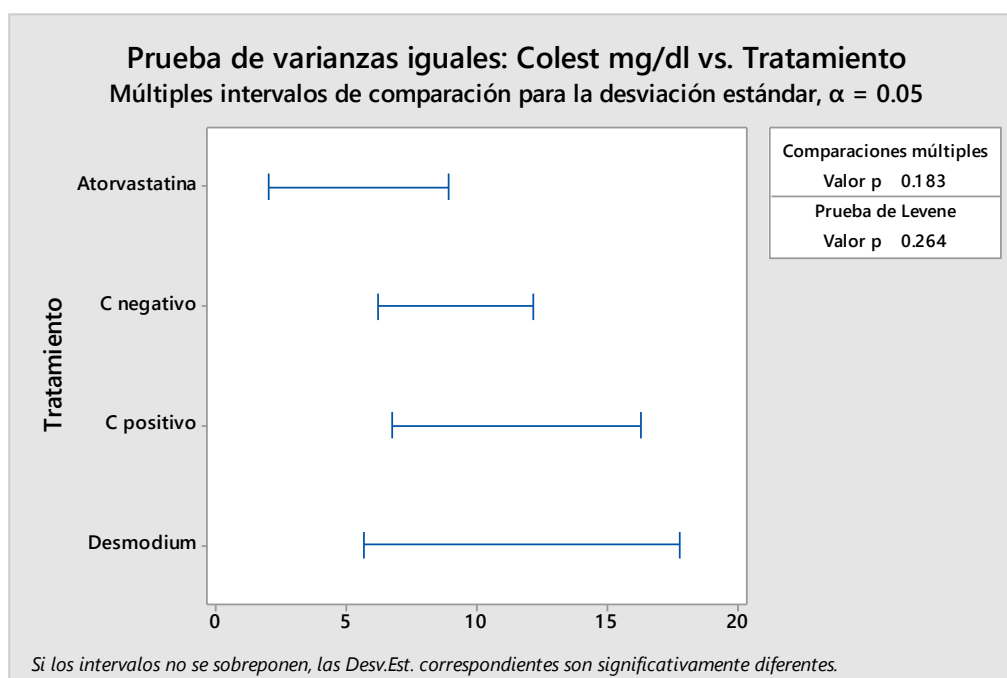
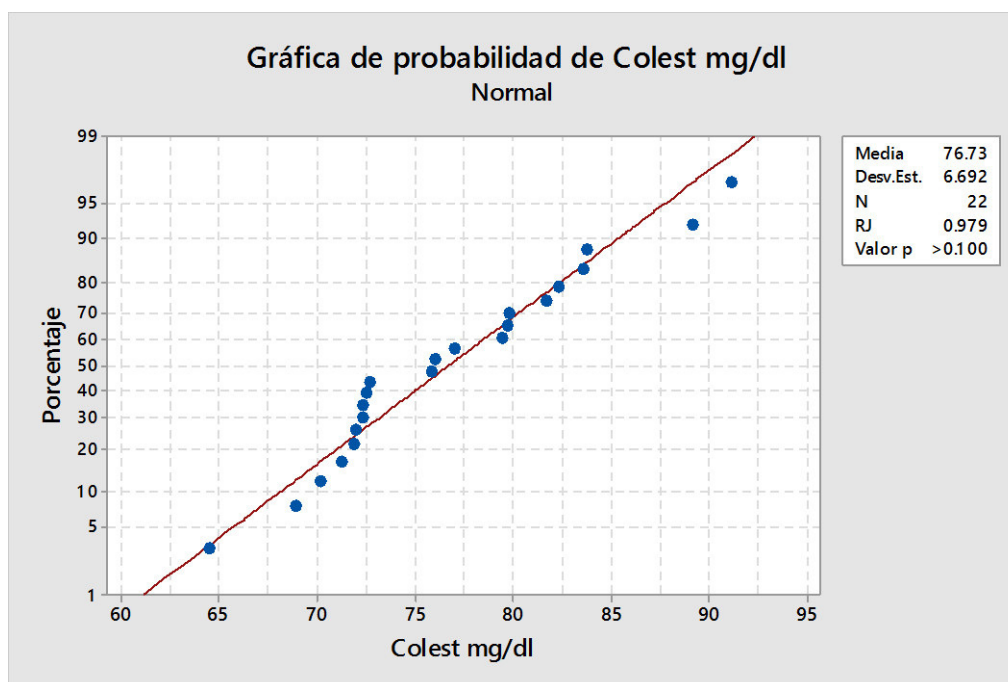
N°	Tratamiento	Dosis	Colesterol total	HDL	LDL	VLDL	Trigliceridos Total
1	Control Normal (suero fisiológico)	5 mL/kg	59,42	32,22	8,27	18,93	94,64
2			54,17	30,61	9,41	14,15	70,73
3			56,23	31,12	6,58	18,53	92,63
4			56,40	32,80	10,03	13,57	67,85
5			57,07	29,77	10,58	16,72	83,58
6			51,24	25,50	5,28	20,46	102,3
7	Inducción de hipercolesterolemia	200 mg colesterol/kg	74,55	37,51	11,48	25,56	127,80
8			58,66	28,76	7,86	22,04	110,20
9			87,78	40,54	23,70	23,54	117,70
10			63,05	31,62	14,21	17,22	86,08
11			44,37	16,65	5,54	22,18	110,90
12			53,39	23,74	23,74	15,31	176,55

Perfil lipídico de grupo dieta normal (control negativo) y grupo de inducción de hipercolesterolemia (control positivo) luego de 4 semanas de inducción con colesterol 200 mg/kg peso corporal. Elaboración propia

III. RESULTADOS DE PERFIL LIPÍDICO DESPUÉS DEL PERIODO DE TRATAMIENTO

Código	Tratamiento	Dosis	Colesterol total mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	VLDL mg/dl	Trigliceridos total mg/dl
R1	(1) Control negativo	Suero fisiológico 5 ml/kg	83,53	33,93	37,62	11,98	59,90
R2			72,34	36,66	23,23	12,45	62,24
R3			83,74	51,45	15,27	17,02	85,12
R4			68,90	31,12	19,70	18,08	90,42
R5			79,72	54,55	10,33	14,84	74,18
R6			71,29	51,73	4,10	15,46	77,29
V1	(2) Control positivo	Colesterol en aceite de oliva 200 mg/kg	89,14	45,39	29,71	14,04	70,19
V2			81,67	45,94	23,17	12,56	62,78
V3			72,53	41,97	11,71	18,85	94,26
V4			72,72	50,79	3,78	18,15	90,73
V5			91,15	61,78	15,76	13,61	68,07
V6			79,80	40,14	26,35	13,31	66,54
N2	(3) Ext. alcohol. de hojas de <i>D. molliculum</i> manayupa	Extracto seco 500 mg/kg	79,44	57,92	9,11	12,41	62,04
N3			72,34	47,67	6,46	18,21	91,03
N4			71,98	36,36	21,00	14,62	73,10
N5			64,55	39,01	14,24	11,30	56,48
N6			82,36	49,50	13,32	19,54	97,72
A1	(4) Atorvastatina	Atorvastatina 2 mg/kg	71,90	48,28	1,14	22,48	112,4
A2			76,00	45,96	12,74	17,30	86,50
A3			75,84	32,51	28,23	15,10	75,50
A4			76,97	43,74	17,37	15,86	79,29
A6			70,22	49,17	1,99	19,06	95,30

IV. GRÁFICAS DEL ANÁLISIS POR ANOVA DE LOS GRUPOS DESPUES DEL TRATAMIENTO



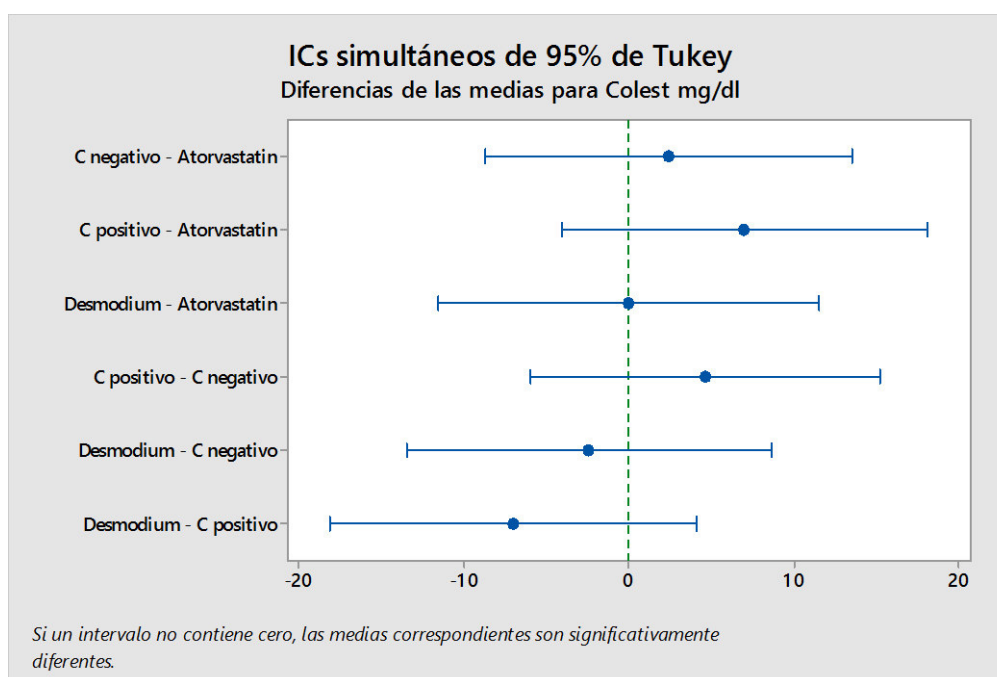
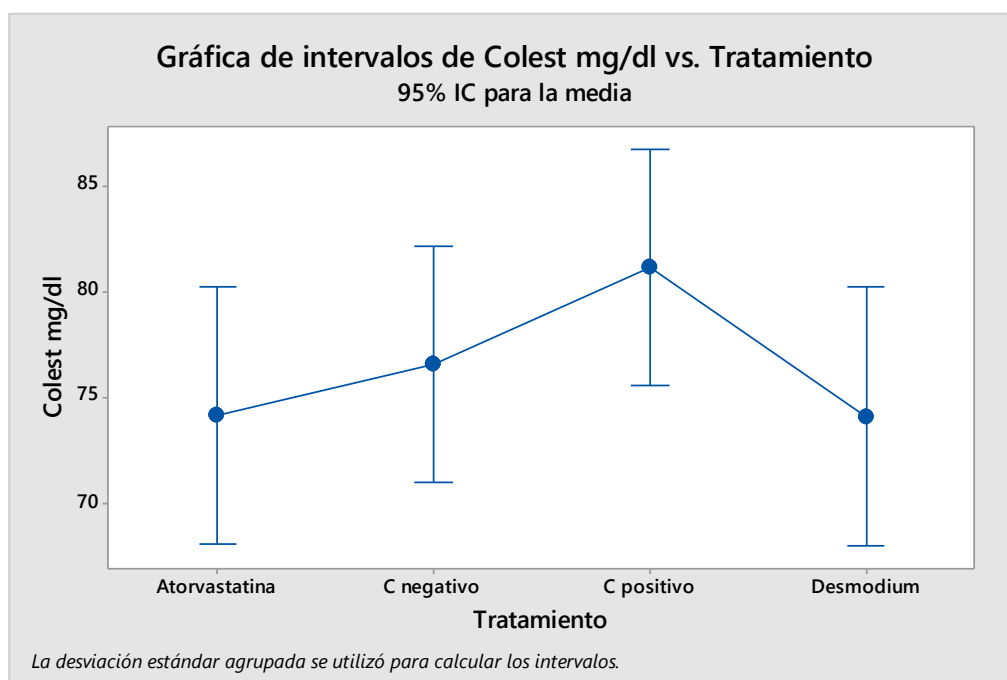
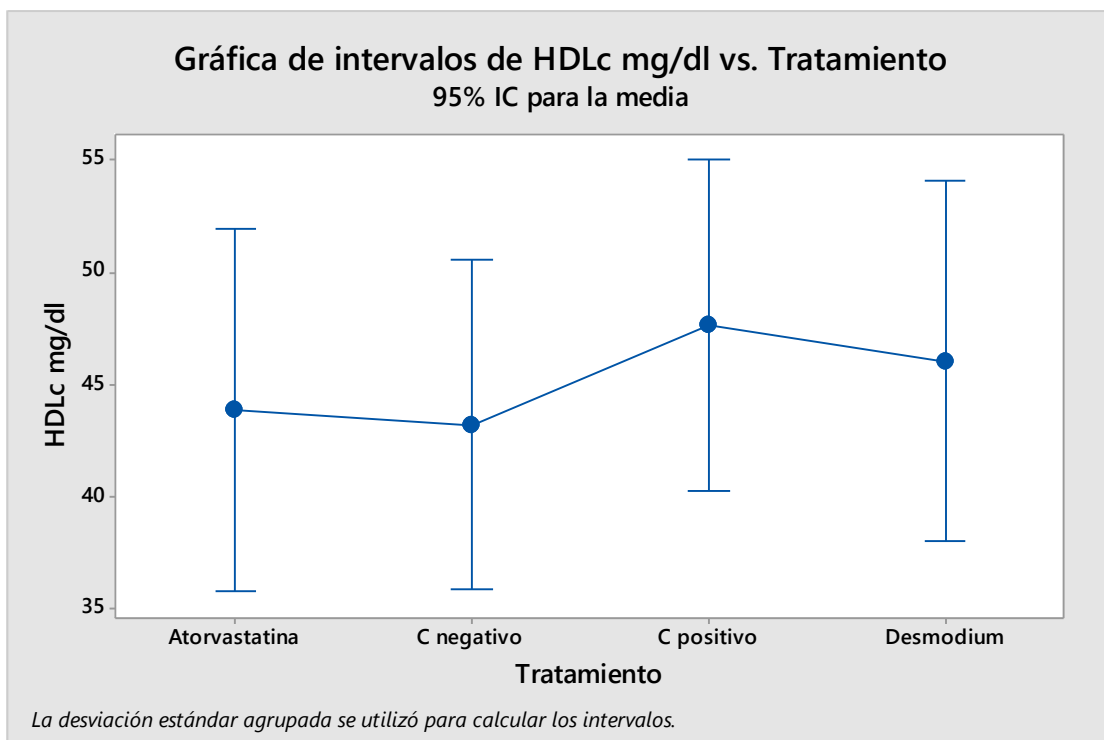
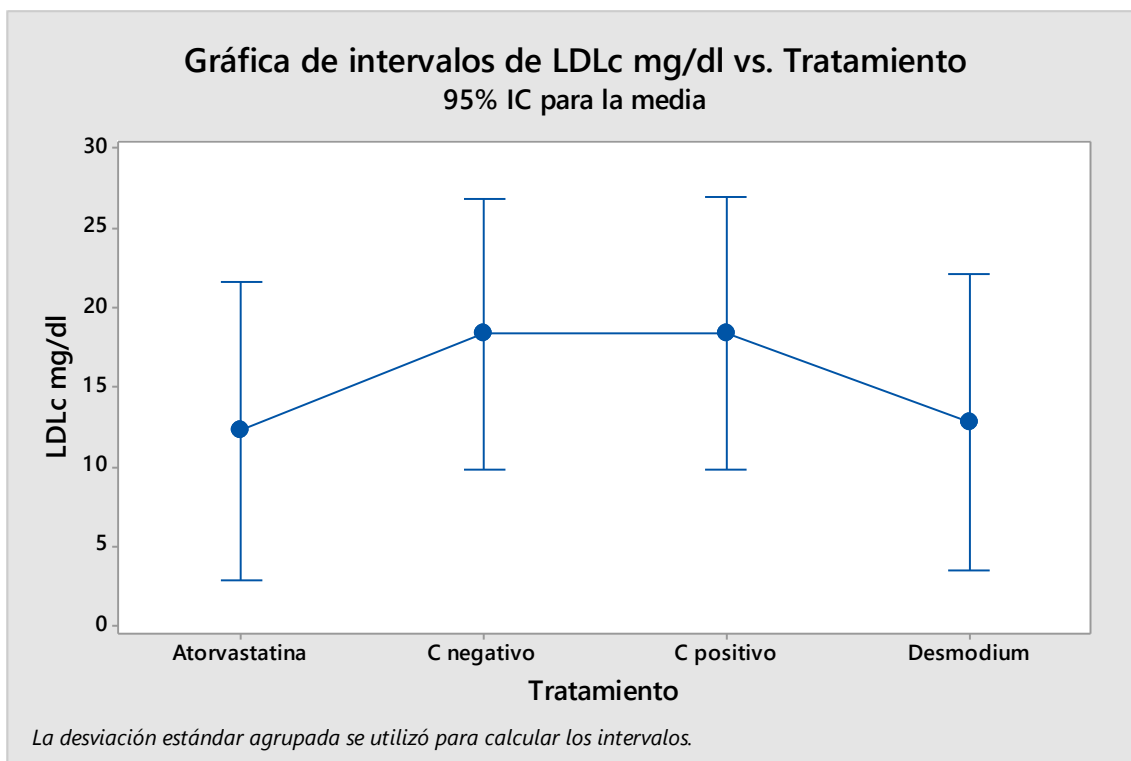
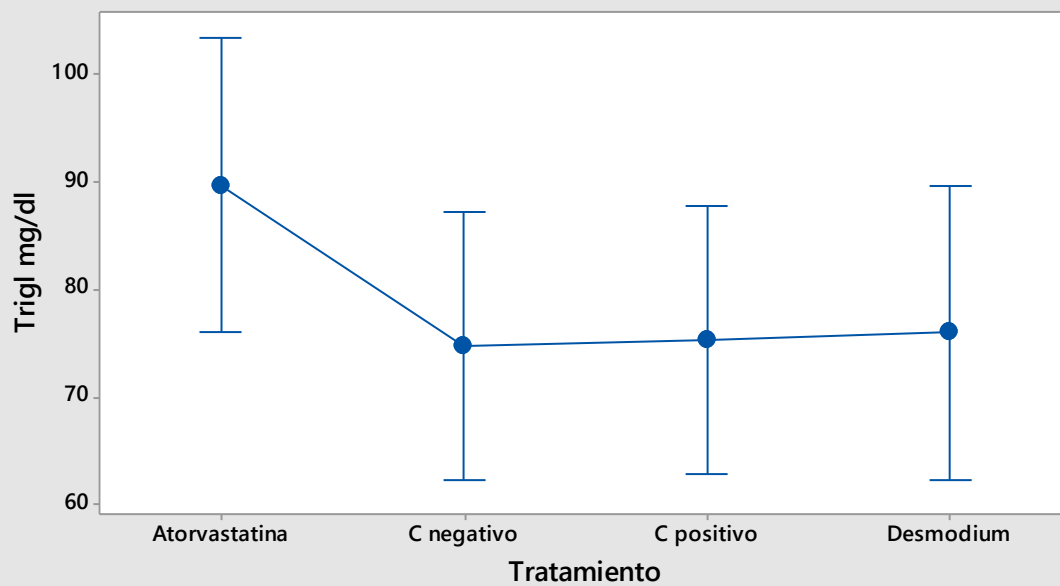


Figura. Prueba post test comparaciones múltiples entre grupos luego de periodo de tratamiento de 30 días.

V. ANALISIS ANOVA: INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LDLc, HDLc y TRIGLICÉRIDOS AL FINAL DEL TRATAMIENTO



Gráfica de intervalos de Trigl mg/dl vs. Tratamiento
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.